

ÜBER DIE HEMMBARKEIT LEUCOCYTÄRER PROTEASEN
DURCH EINEN NIEDERMOLEKULAREN INHIBITOR AUS
DEM FLIMMEREPITHEL DER OBEREN LUFTWEGE

Monika Elisabeth Matzner

1973

Aus dem biochemischen Laboratorium (Leitung:
Priv.Do^z.Dr.K.Hochstraßer) der Hals-Nasen-
Ohrenklinik der Universität München (Direktor:
Prof.Dr.H.H.Naumann)

ÜBER DIE HEMMBARKEIT LEUCOCYTÄRER PROTEASEN
DURCH EINEN NIEDERMOLEKULAREN INHIBITOR AUS
DEM FLIMMEREPITHEL DER OBEREN LUFTWEGE

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten
Medizin verfaßt und einer Hohen Medizinischen
Fakultät der Ludwig Maximilians- Universität
zu München

vorgelegt von
Monika Elisabeth Matzner
aus
München

München 1971

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität München

1. Berichterstatter: Priv.Doz.Dr.K.Hochstraßer
2. Berichterstatter: Prof.Dr.H.H.Naumann
Dekan: Prof.Dr.W.Spann
Tag der mündlichen Prüfung: 26. 6. 1973



Inhaltsverzeichnis

Über die Hemmbarkheit leucocytärer Proteasen durch einen niedermolekularen Inhibitor aus dem Flimmer- epithel der oberen Luftwege

	Seite
Gliederung	I - V
1. Stellung des Themas	1
2. Begriffserklärungen	2
2.1 Hemmspektren der Inhibitoren des Flimmer- epithels der oberen Luftwege	2
2.11 Beschreibung und Charakterisierung des Nasensekret-Inhibitors (NSI)	2
2.12 Beschreibung und Charakterisierung des Bronchialsekret-Inhibitors (BSI)	3
2.13 Temporäre Hemmung	3
2.2 Beschreibung der leucocytären Proteasen	4
2.21 Definition von Proteasen	4
2.22 Definition und Funktionsweise von Leucocyten	4
2.3 Funktion der Inhibitoren in Bezug auf leuco- cytäre Proteasen	5
3. Ergebnisse	5
3.1 Fraktionierung und Aktivitätsbestimmung des Leucocytenhomogenats	6

3.2	Hemmbarkeit der Leucocytenproteasen durch Nasensekret-Inhibitor	6
3.3	Hemmbarkeit der Leucocytenproteasen durch Bronchialsekret-Inhibitor (BSI)	7
3.4	Hemmbarkeit leucocytärer Proteasen durch verschiedene Inhibitoren	8
3.5	Chemische Struktur des aktiven Zentrums leucocytärer Proteasen	8
3.6	Proteolytisch wirksames Nasensekret (Ozaena) als Spezialfall	9
4.	Untersuchungen für das Zustandekommen der Ergebnisse	
4.1	Voraussetzungen für die Untersuchungen der Hemmungen leucocytärer Proteasen	9
4.11	Konzentration und Auftrennung der leucocytären Proteasen	9
4.12	Aktivitätsbestimmung in den Leucocyten-Fractionen	10
4.13	Aktivitätsbestimmung des Leucocytenhomogenats bei verschiedenen pH-Werten	10
4.2	Hemmung der Leucocytenproteasen durch Nasensekret-Inhibitor (NSI)	10
4.21	Hemmung leucocytärer Proteasen durch NSI bei verschiedenen pH-Werten	11
4.22	Hemmung der leucocytären Fractionen mit NSI	12
4.23	Temporäre Hemmung leucocytärer Proteasen mit NSI	13
4.3	Hemmung der Leucocytenproteasen durch Bronchialsekret-Inhibitor (BSI)	13

	Seite
4.31 Berechtigung der Frage nach BSI	13
4.32 Nachweis von inhibitorischer Aktivität im Bronchialsekret	14
4.33 Nachweis von α_1 -Antitrypsin im Bronchialsekret	14
4.34 Säurebehandlung des Bronchialsekrets	15
4.35 Hemmung der Leucocytenfraktionen L_I und L_{II} durch BSI bei verschiedenen pH-Werten	16
4.36 Temporäre Hemmung leucocytärer Proteasen mit BSI	17
4.4 Hemmung leucocytärer Proteasen durch verschiedene Inhibitoren	17
4.41 Pflanzliche Inhibitoren	18
4.42 Tierische Inhibitoren	18
4.43 Plasmainhibitoren	18
4.5 Chemische Untersuchungen der Struktur des aktiven Zentrums leucocytärer Proteasen	19
4.51 Prüfung leucocytärer Proteasen auf einen Serinrest im aktiven Zentrum	20
4.511 Prüfung auf Trypsinähnlichkeit	20
4.512 Prüfung auf Chymotrypsinähnlichkeit	20
4.513 Prüfung durch Hemmung mit Diisopropyl - fluor - phosphat (DFP)	21
4.52 Prüfung der leucocytären Proteasen auf Kathepsinähnlichkeit	21
4.521 Prüfung auf SH-Gruppe im aktiven Zentrum	22
4.522 Inaktivitätsversuche mit Komplexbildnern	22

4.6	Proteolytisch wirksames Nasensekret (Ozaena) als Spezialfall	22
4.61	Definition und Entstehungsursache der Ozaena	23
4.62	Nachweis von proteolytischer Aktivität im Ozaena-Nasensekret	23
4.63	Säurebehandlung des proteolytisch wirksamen Ozaena-Nasensekrets	23
4.64	Hemmung des proteolytisch wirksamen Nasensekrets	24
4.641	Hemmung des proteolytisch wirksamen Nasensekrets mit NSI	25
4.642	Versuche zur Hemmbarkeit des proteolytisch wirksamen Nasensekrets durch HSMI	25
5.	Material und Methoden	26
5.1	Grundmaterial	26
5.11	Enzyme	26
5.12	Substrate	26
5.13	Inhibitoren	26
5.14	Säulenfüllungen	27
5.15	Antiserum	27
5.2	Gewinnung des Untersuchungsmaterials und dessen Gelfiltration	27
5.21	Gewinnung von Nasensekrethomogenat	27
5.22	Gewinnung von Bronchialsekrethomogenat	27
5.23	Gewinnung von Leucocytenhomogenat	27
5.24	Gelfiltration des Untersuchungsmaterials	28

5.3 Weitere Aufarbeitung der Homogenate und Konzentrate	29
5.31 Enteiweißung	29
5.32 Einengung	29
5.33 Entsalzung	29
5.34 Lyophilisierung	30
5.4 Methodischer Aufbau der Versuchsreihen	30
5.41 Bestimmung der Enzymhemmung	30
5.411 Hemmung von Trypsin	30
5.412 Hemmung von Chymotrypsin	32
5.413 Hemmung von Leucocytenproteasen	33
5.42 Nachweis von α_1 -Antitrypsin	34
6. Das Untersuchungsergebnis in seiner Bedeutung	35
6.1 Zusammenfassung	35
6.2 Ausblick	36

1. Stellung des Themas

Die Isolierung von Proteasen-Inhibitoren aus pflanzlichen, tierischen und menschlichen Geweben war in den letzten Jahren ein wesentlicher Gegenstand bei der Erforschung dieser Inhibitoren und ihrer Aufgaben. Der chemischen Struktur nach sind Proteasen-Inhibitoren Proteine, Polypeptide oder Glykoproteide mit der Fähigkeit, Proteasen zu hemmen. Im allgemeinen sind sie polyvalenter Natur, d.h. sie vermögen oft mehrere Proteasen zu hemmen.

Im Rahmen der bisherigen Inhibitorenforschung ergab sich die Frage, ob nicht auch in den oberen menschlichen Luftwegen solche Hemmstoffe vorhanden sind. Der Arbeitskreis Hochstraßer stellte sich die Aufgabe, dieses Problem experimentell anzugehen und in seiner Konsequenz zu untersuchen.

Die Ergebnisse bei der Untersuchung des Nasensekrets ergaben, daß darin ein Stoff existiert, der inhibitorische Fähigkeiten besitzt und der in der Lage ist, proteolytische Enzyme wie Trypsin, Chymotrypsin und Pronase zu hemmen (1).

Aus der Hemmwirkung des Inhibitors diesen Enzymen gegenüber läßt sich keine physiologische Aufgabe ableiten. Daher wurde für diese Arbeit das Thema gestellt, zu untersuchen, ob dieser von dem Flimmerepithel der oberen Luftwege sezernierte Inhibitor neben den eben erwähnten proteolytischen Enzymen auch andere Proteasen zu hemmen vermag.

Bei jeder Entzündung diffundieren Leucocyten aus der Blutbahn in das entzündete Gewebe bzw. bei Entzündungen des Flimmerepithels in die entsprechenden Sekrete. Durch Leucocytenzerfall freigesetzte leucocytaire Proteasen entfalten dort ihre proteolytische Wirksamkeit. Bisher wird angenommen, daß die proteolytische Aktivität dieser leucocytairen Proteasen in den Sekreten teilweise durch ebenfalls diffundierte Serum-Inhibitoren gehemmt wird.

Die Beweisbarkeit der im Thema aufgeworfenen Frage würde zu der berechtigten Annahme führen, den in diesem Bereich befindlichen Inhibitoren eine physiologische Funktion zuzuordnen.

2. Begriffserklärungen

2.1 Hemmspektren der Inhibitoren des Flimmerepithels der oberen Luftwege

2.1.1 Umschreibung und Charakterisierung des Nasensekret-Inhibitors (NSI)

Der im menschlichen Nasensekret als existent nachgewiesene Inhibitor (=NSI) stellt sich dar als ein Polypeptid mit der besonderen Wirkweise, eine hemmende Funktion auf bestimmte proteolytische Enzyme auszuüben. Im Arbeitskreis Hochstraßer konnte nachgewiesen werden, daß dieser NSI Trypsin, Chymotrypsin und Pronase (eine Pilzprotease aus *Streptomyces griseus*), nicht dagegen Plasmin, Kallikrein, Subtilopeptidase A und Pankreatopeptidase E zu hemmen vermag (1).

Der Hemmstoff ist ein sogenannter Lysininhibitor, d.h. seine inhibitorische Aktivität Trypsin gegenüber wird durch einen Lysinrest im sogenannten reaktiven Zentrum repräsentiert. Die Hemmwirkung kann durch Maleoylisierung aller ϵ -Aminogruppen reversibel beseitigt werden(?). Die verschiedenen reaktiven Zentren des Inhibitors sind entweder für die Inaktivierung von Trypsin oder von Chymotrypsin verantwortlich.

Das Molekulargewicht des Inhibitors beträgt ungefähr 13.000. Infolgedessen kann dieser niedermolekulare Stoff gut gegen eventuell sezernierte höhermolekulare Antitrypsine aus dem Serum abgegrenzt werden (1).

2.12 Beschreibung und Charakterisierung des Bronchialsekret-Inhibitors (BSI)

Im Rahmen der hier vorgelegten Arbeit wird nachgewiesen, daß auch in dem Flimmerepithel der Bronchialschleimhaut ein Inhibitor sezerniert wird, der gleiche Merkmale wie der NSI aufweist. Diese Tatsache legt die Annahme einer Identität des BSI mit dem zuvor beschriebenen NSI nahe. Darauf deuten vor allem das gleiche Molekulargewicht und die gleiche Hemmcharakterisierung hin (3).

2.15 Temporäre Hemmung

Der Begriff der 'temporären Hemmung' wurde von Laskowski und Wu (4) vorgeschlagen für eine Reaktion, bei der ein Proteinasen-Inhibitor mit Trypsin einen Komplex bildet, der nach längerer Inkubation jedoch in freies Trypsin und in tryptische Spaltprodukte des Inhibitors zerfällt. Proteinasen ^{unlike} ~~act~~ also Enzyme in ihrer Aktivität, stellen selbst aber ein Substrat für das betreffende Enzym dar. Die Inhibierung von Trypsin ist in diesem Fall temporär. Die Inhibitoren mit dieser Eigenschaft werden als 'temporäre Inhibitoren' bezeichnet.

Für die Geschwindigkeit der Abnahme der Inhibitoraktivität ist dabei das Verhältnis Trypsin zu Inhibitor verantwortlich. Für den Abbau der Inhibitoraktivität gäbe es zwei Erklärungsmöglichkeiten, zum einen das Angreifen eines freien Trypsinmoleküls am Komplex, zum anderen die direkte Spaltung des Inhibitors durch das im Komplex gebundene Trypsin.

Die Reaktionen können wie folgt dargestellt werden:



Beide Reaktionen wären denkbar. Der Zusatz freien Trypsins zum Trypsin-Inhibitor-Komplex erhöht die Abbaugeschwindigkeit (R_1) des Inhibitors, ein Inhibitorüberschuß verlangsamt sie (R_2). Die Inhibitoren des Flimmerepithels sind jedoch auch in Gegenwart von überschüssigem Trypsin stabil, sie vermögen Trypsin permanent zu hemmen.

2.2 Beschreibung der leucocyitären Proteasen

2.21 Definition von Proteasen

Proteasen sind Enzyme mit der Fähigkeit, die hydrolytische Spaltung von Peptidbindungen (C-N) zu katalysieren. Sie unterteilen sich in Endopeptidasen (synonym Proteinasen) und Exopeptidasen (synonym Peptidasen). Unterscheidungskriterium der beiden Gruppen ist die Art des Angriffs. Die hier zu untersuchenden leucocyitären Proteasen gehören zur Gruppe der Endopeptidasen (5).

2.22 Definition und Funktionsweise von Leucocyten

Leucocyten werden im Knochenmark gebildet und gelangen durch Emigration in die Blutbahn. Darunter fallen alle Arten von Granulocyten (67% - 69%), Lymphocyten (15% - 30%) und Monocyten (3% - 5%). Die Wirkungsweise dieser Zellen besteht hauptsächlich in der Abwehr pathogener Bakterien durch Phagocytose. Beim Leucocytenverfall werden neben anderen Enzymen auch Proteasen freigesetzt.

Leucocytaire Proteasen, die in der hier vorliegenden Arbeit zu Untersuchungen verwendet werden, sind nur in Granulocyten und Monocyten enthalten, nicht dagegen in Lymphocyten (6).

Bei jeder akuten Entzündung werden im entzündeten Gewebe Gewebsproteasen aktiviert, die ihrerseits wieder das entzündungsverstärkende Kallikrein-Kinin-System aktivieren (7). Diese Aktivierung wird außerdem durch Bakterienproteasen und proteolytische Enzyme zerfallender Leucocyten ausgelöst. Das Kallikrein-Kinin-System bewirkt eine Blutdrucksenkung und eine Erhöhung der Gefäßpermeabilität, wodurch Leucocyten leicht durch die permeabel gewordenen Blutgefäße in das entzündete Gebiet diffundieren können. Dort bilden sie den sogenannten 'Eiter'.

2.3 Funktionen der Inhibitoren in Bezug auf leucocytäre Proteasen

Proteolytische Enzyme verursachen eine Verschiebung des physiologischen Gleichgewichts. Zur Wiederherstellung dieses Gleichgewichts konnte bereits ein unter α_1 - Antitrypsin bekannter aus dem Serum stammender Stoff nachgewiesen werden, der Leucocyten zu hemmen vermag und damit unter anderem eine Schutzfunktion bei Infektionen ausübt. Für die gleiche Aufgabe wäre die Existenz eines direkt in der Schleimhaut der oberen Luftwege sezernierten Inhibitors sinnvoll, der proteolytische Enzyme durch Komplexbildung zu binden und damit zu inaktivieren vermag.

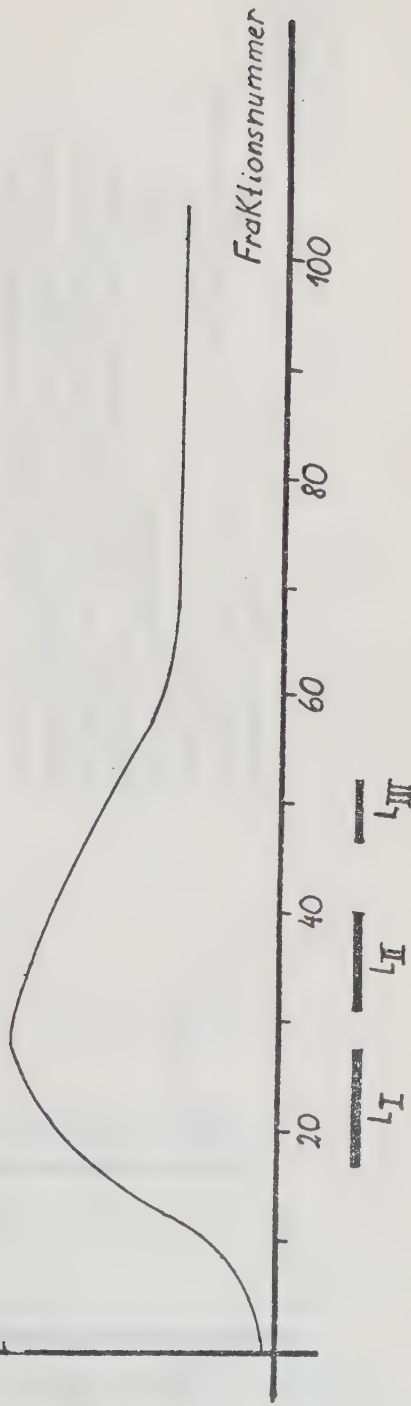
Im Arbeitskreis Hochstraßer wurde ein solcher, vom Flimmer-epithel der Nasenschleimhaut sezernierter Inhibitor gefunden (NSI), der die zuvor erwähnte Schutzfunktion für die Nasenschleimhaut übernehmen könnte. Deshalb wurde dieser Stoff auf seine Hemmwirkung proteolytischen Enzymen gegenüber geprüft.

3. Ergebnisse

$E_{rd} 280$

ABB.1

Legende zu Abb.1:
Fraktionierung von Leucocytenkonzentrat:
Chromatographie an Sephadex-G-100;
Elutionspuffer: Boratpuffer 0,05 M, pH 8,0;
Säule: 1,7 x 175 cm;
Fraktionen zu 4 ml;
Die Extinktionskurve ist eine übertragene
Uvicordkurve.



ΔE_{366}

ABB. 2

Legende zu Abb. 2:

Proteolytische Aktivität der einzelnen Leucocytenfraktionen:

Substrat: Azocasein;

Inkubationsansatz: 0,1 ml Leucocytenfraktion, aufgefüllt ad 1 ml mit Kalium-Natrium-Phosphatpuffer (0,1 M, pH 8,0); 2 ml 2%iges Azocasein in gleichen Puffer gelöst; Inkubation während einer Stunde bei 37°; 3 ml 5%ige Trichloressigsäure als Fällungsmittel; der Überstand wurde gegen einen Leerwert von Azocasein bei 366 nm gemessen.

$L_{II} = 32,5\%$

$L_I = 65\%$

$L_{III} = 5\%$

2

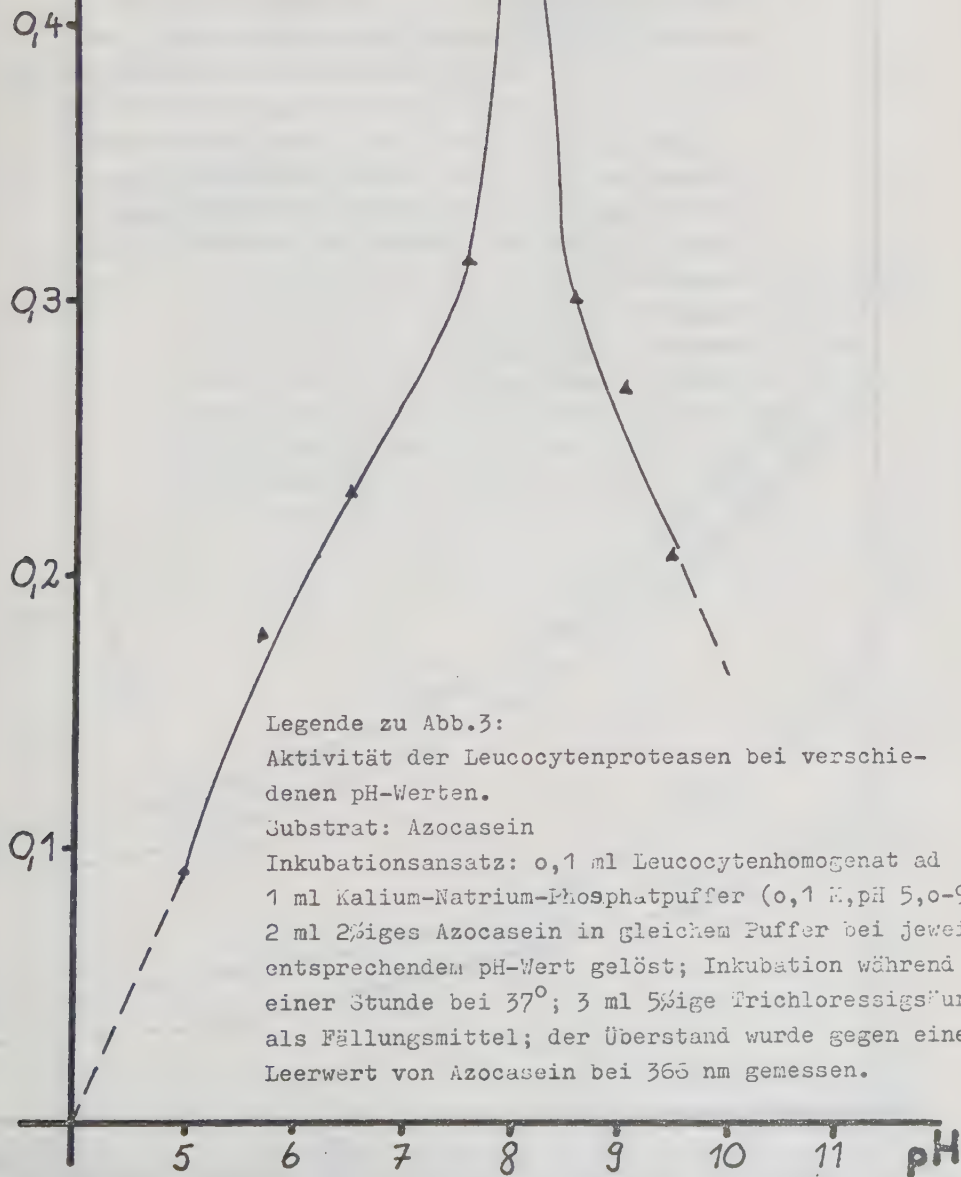
3

1

Zahl der Leucocytenfraktionen

ΔE_{366}

ABB. 3



Legende zu Abb.3:

Aktivität der Leucocytenproteasen bei verschiedenen pH-Werten.

Substrat: Azocasein

Inkubationsansatz: 0,1 ml Leucocytenhomogenat ad
1 ml Kalium-Natrium-Phosphatpuffer (0,1 M, pH 5,0-9,5)
2 ml 2%iges Azocasein in gleichem Puffer bei jeweils
entsprechendem pH-Wert gelöst; Inkubation während
einer Stunde bei 37°; 3 ml 5%ige Trichloressigsäure
als Fällungsmittel; der Überstand wurde gegen einen
Leerwert von Azocasein bei 366 nm gemessen.

Legende zu Abb.4:

Hemmbarkeit von Leucocytenproteasen durch einen Inhibitor des Nasensekrets bei verschiedenen pH-Werten.

Substrat: Azocasein

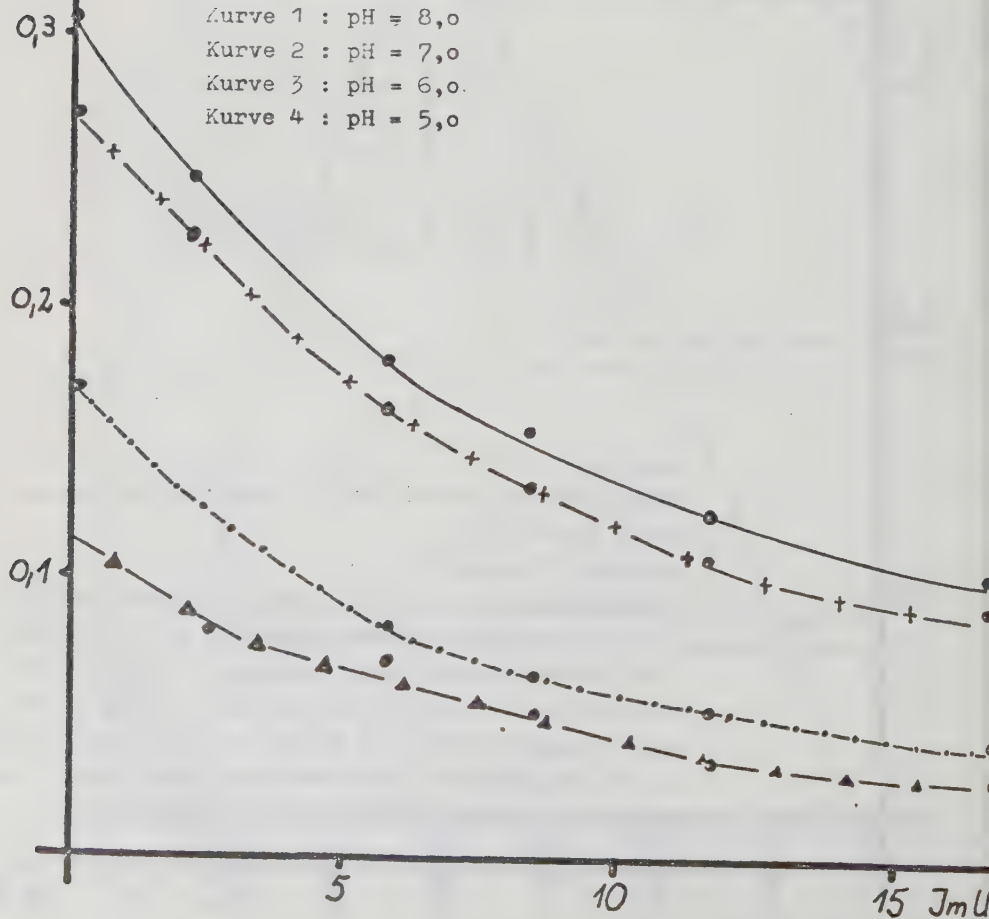
Inkubationsansatz: 0,1 ml Leucocytenhomogenat versetzt mit steigender Inh.-Konzentration, aufgefüllt ad 1 ml mit Kalium-Natrium-Phosphatpuffer (0,1 M, pH 5,0 - 8,0); 2 ml 2%iges Azocasein in gleichem Puffer gelöst; Inkubation während zwei Stunden bei 37°; 3 ml 5%ige Trichloressigsäure als Fällungsmittel; der Überstand wurde gegen einen Leerwert von Azocasein bei 366 nm gemessen.

Kurve 1 : pH = 8,0

Kurve 2 : pH = 7,0

Kurve 3 : pH = 6,0

Kurve 4 : pH = 5,0



ΔE_{366}

ABB. 5

Legende zu Abb.5:

Hemmung der Leucocytenfraktion L_I mit NSI:

Substrat: Azocasein;

Inkubationsansatz: 0,1 ml L_I versetzt mit steigender NSI-Konzentration, aufgefüllt ad 1 ml Natrium-Kalium-Phosphatpuffer (0,1 M, pH 8,0). Inkubation während zwei Stunden bei 37°; 2 ml 2%ige Azocaseinlösung (gelöst im gleichen Puffer); 3 ml 5%ige Trichloressigsäure als Fällungsmittel; der Überstand wurde gegen einen Azocaseinleerwert bei 366 nm gemessen.

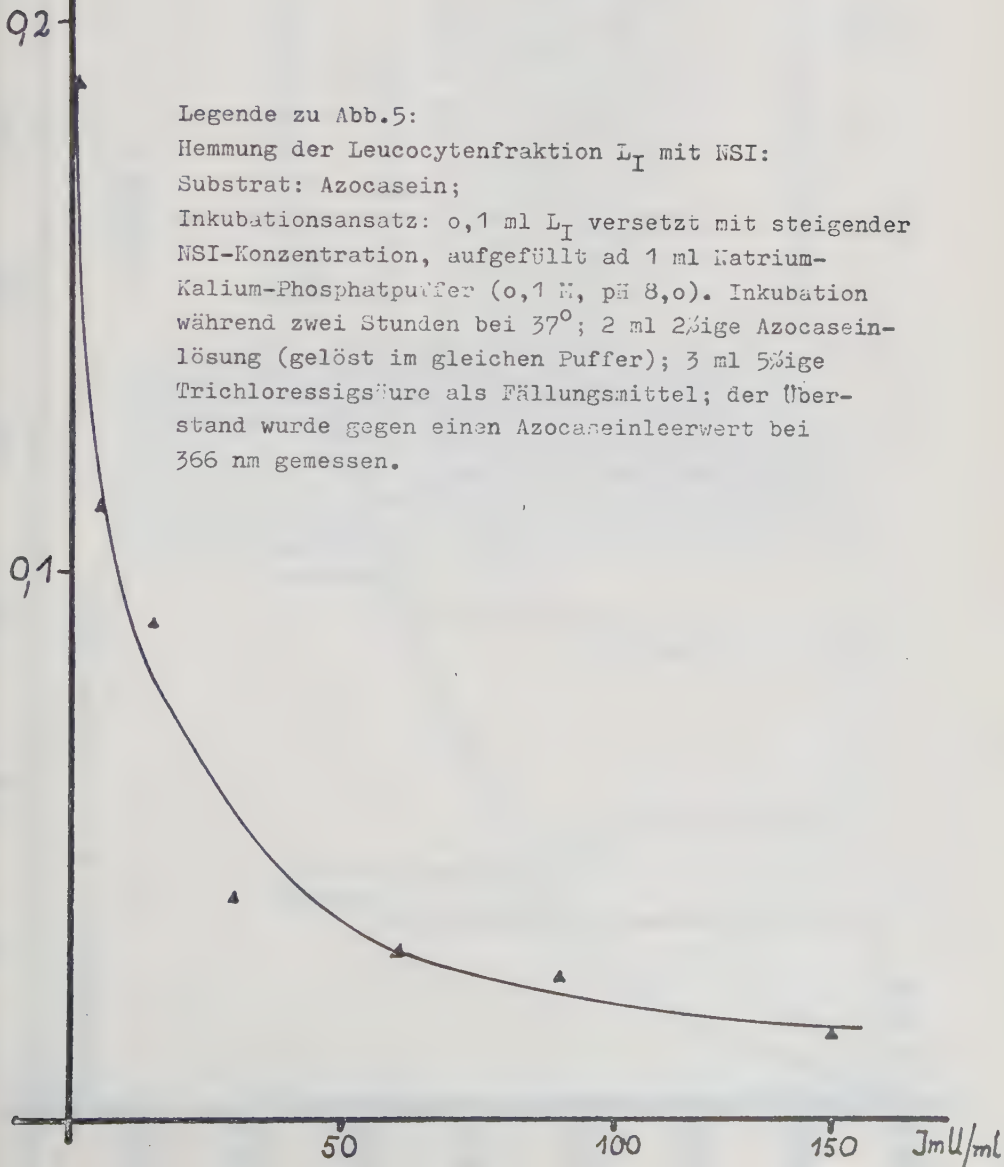


ABB.6

Legende zu Abb.6:
Hemmung der Leucocytenfraktionen L_{II} und L_{III}
mit NSI:

Substrat: Azocasein

Inkubationsansatz: 0,1 ml L_{II} bzw. 0,3 ml L_{III},
versetzt mit steigender NSI-Konzentration, auf-
gefüllt ad 1 ml mit Natrium-Kalium-Phosphatpuffer
(0,1 M, pH 8,0); Inkubation während zwei Stunden
bei 37°; 2 ml 2%ige Azocaseinlösung (gelöst in
gleichem Puffer); 3 ml 5%ige Trichloressigsäure
als Fällungsmittel; der Überstand wurde gegen
einen Azocaseinleerwert bei 366 nm gemessen.

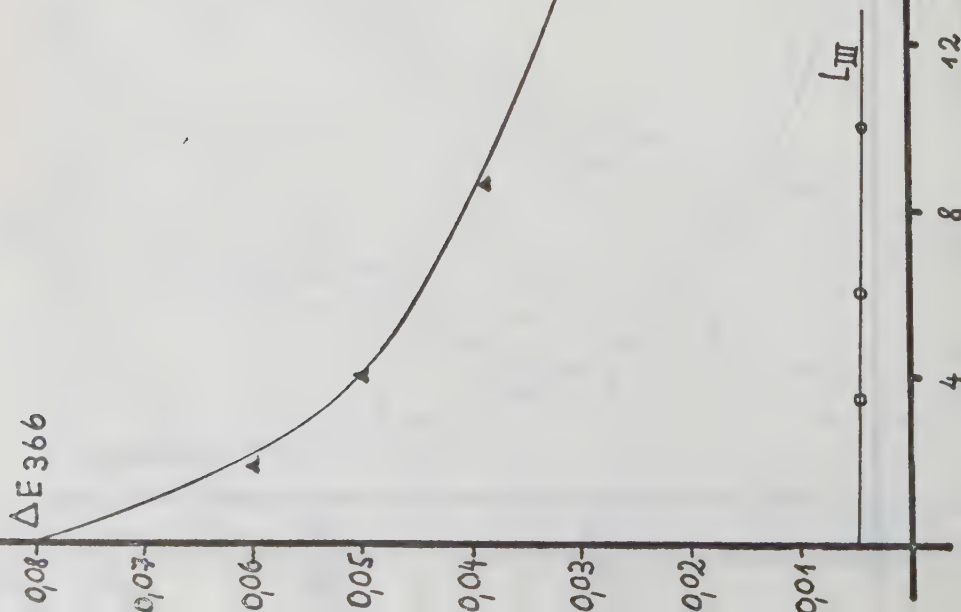
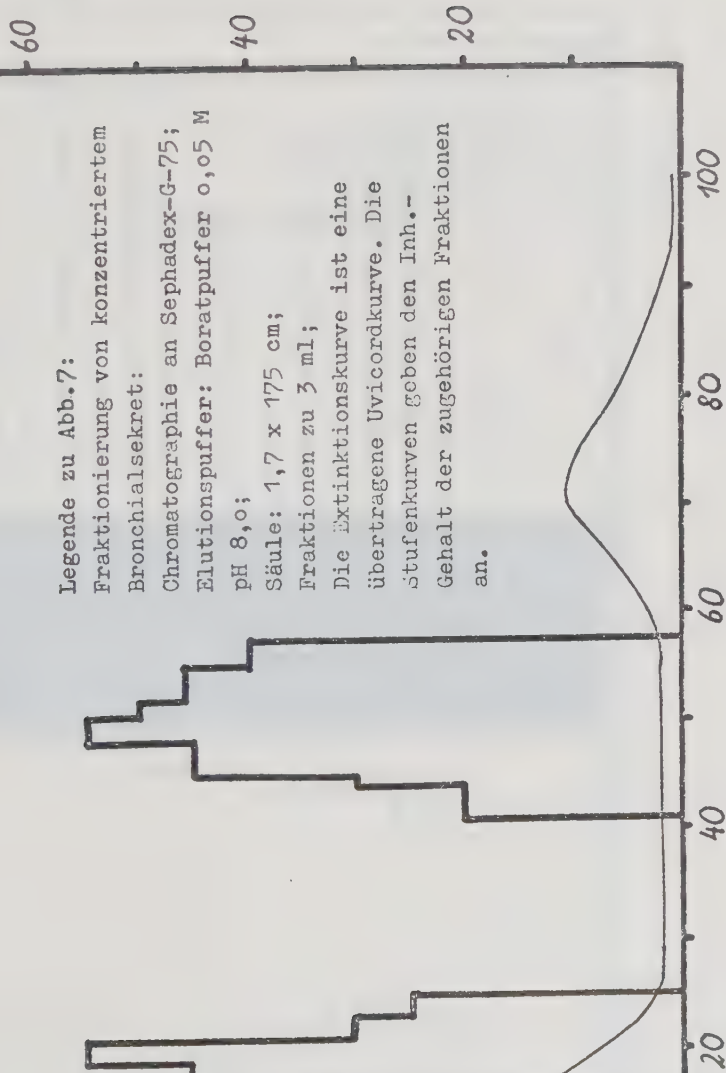


ABB.7

Jm U/Fraktion

Legende zu Abb.7:
 Fraktionierung von konzentriertem
 Bronchialsekret:
 Chromatographie an Sephadex-G-75;
 Elutionspuffer: Boratpuffer 0,05 M
 pH 8,0;
 Säule: 1,7 x 175 cm;
 Fraktionen zu 3 ml;
 Die Extinktionskurve ist eine
 übertragene Uvicordkurve. Die
 Stufenkurven geben den Inh.-
 Gehalt der zugehörigen Fraktionen
 an.



Legende zu Abb.8:

Immunelektrophorese zum Nachweis von α_1 -Antitrypsin
im Bronchialsekret:

oben: Bronchialsekret

unten: Standardserum

Kanal: Anti- α_1 -Antitrypsinserum

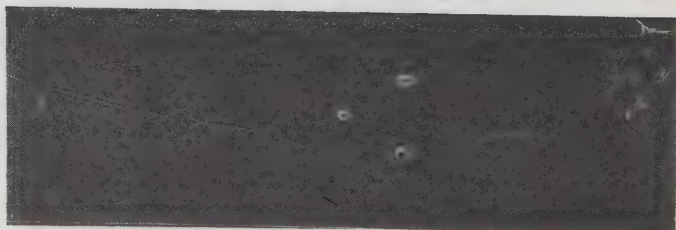


ABB.9

Legende zu Abb.9:

Fraktionierung von konzentriertem
und mit Perchlorsäure behandeltem
Bronchialsekret:

Chromatographie an Sephadex-G-75;

Elutionspuffer: Boratpuffer

0,05 M, pH 8,0;

Säule: 1,7 x 175 cm;

Fraktionen zu 3 ml;

Die Extinktionskurve ist eine

übertragene Uvicordkurve. Die

Stufenkurven geben die Inh.-

Konzentrationen der zugehörigen

Fraktionen an.

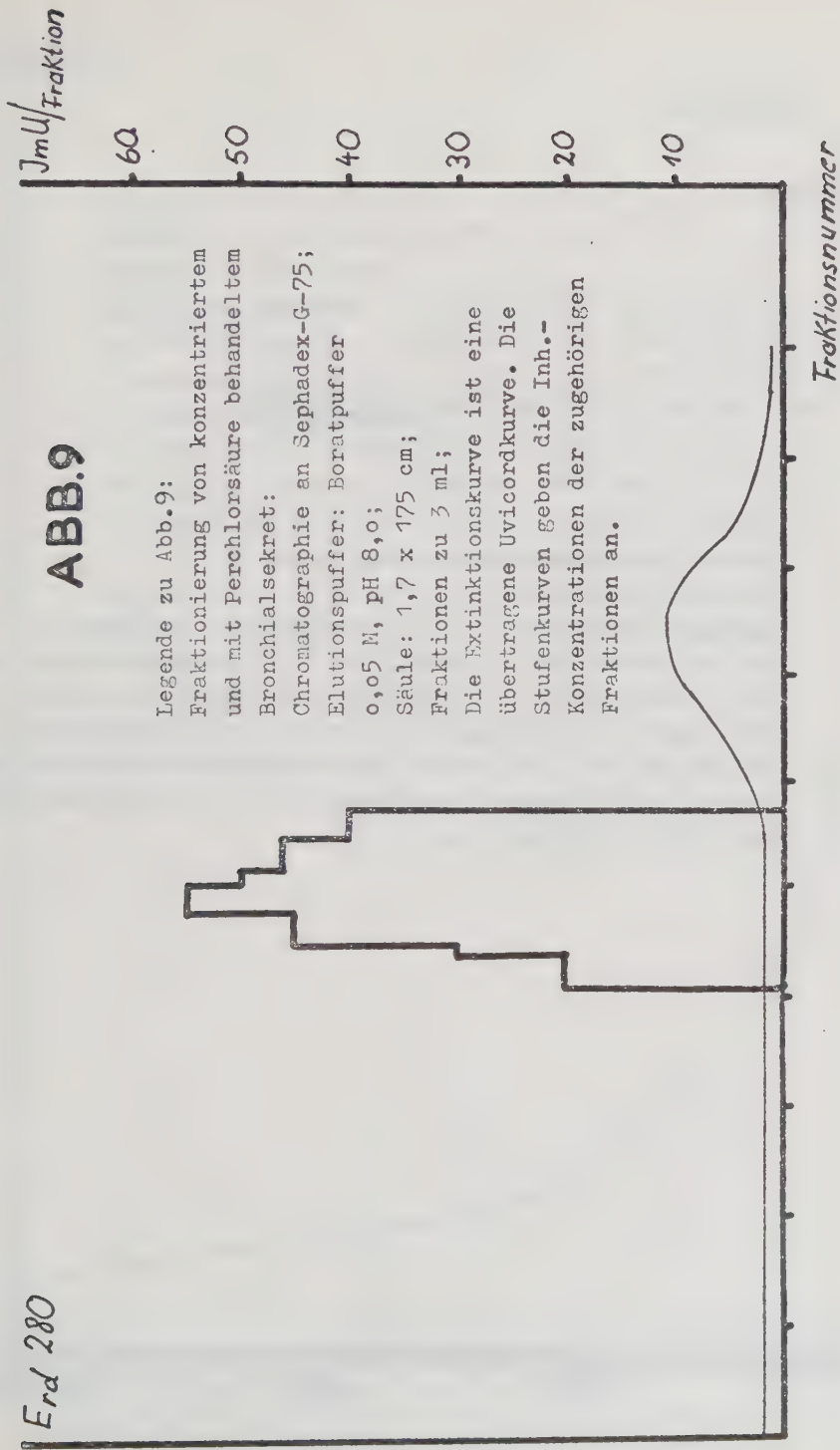


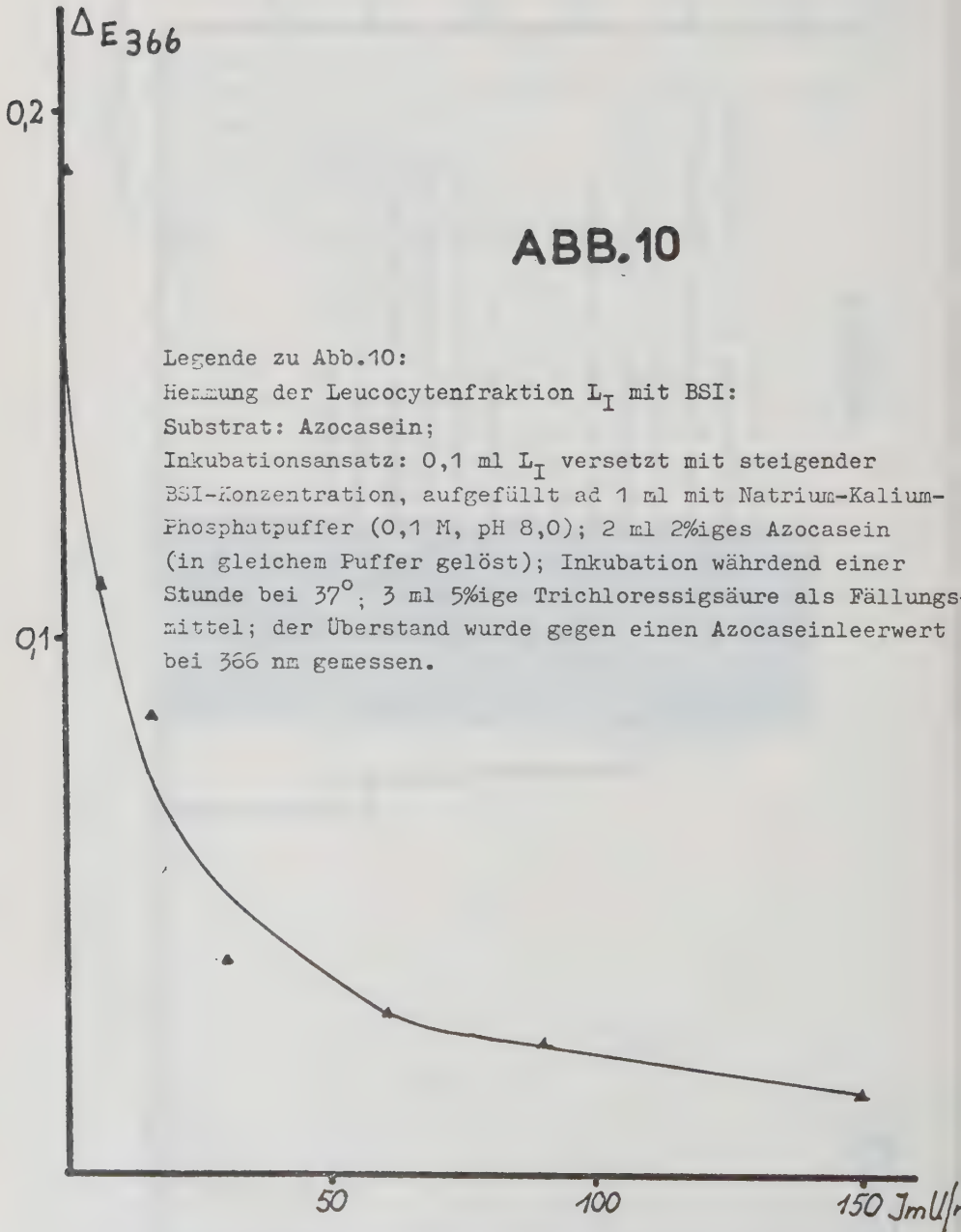
ABB.10

Legende zu Abb.10:

Hemmung der Leucocytenfraktion L_I mit BSI:

Substrat: Azocasein;

Inkubationsansatz: 0,1 ml L_I versetzt mit steigender BSI-Konzentration, aufgefüllt ad 1 ml mit Natrium-Kalium-Phosphatpuffer (0,1 M, pH 8,0); 2 ml 2%iges Azocasein (in gleichem Puffer gelöst); Inkubation während einer Stunde bei 37° ; 3 ml 5%ige Trichloressigsäure als Fällungsmittel; der Überstand wurde gegen einen Azocaseinleerwert bei 366 nm gemessen.



ΔE_{366}

ABB.11

Legende zu Abb.11:

Hemmung der Leucocytenfraktion L_{II} mit BSI:

Substrat: Azocasein;

Inkubationsansatz: 0,1 ml L_{II} versetzt mit steigender BSI-Konzentration, aufgefüllt ad 1 ml mit Natrium-Kalium-Phosphatpuffer (0,1 M, pH 8,0); 2 ml 2%iges Azocasein (in gleichem Puffer gelöst); Inkubation während zwei Stunden bei 37° ; 3 ml 5%ige Trichloressigsäure als Fällungsmittel; der Überstand wurde gegen einen Azocasein-leerwert bei 366 nm gemessen.

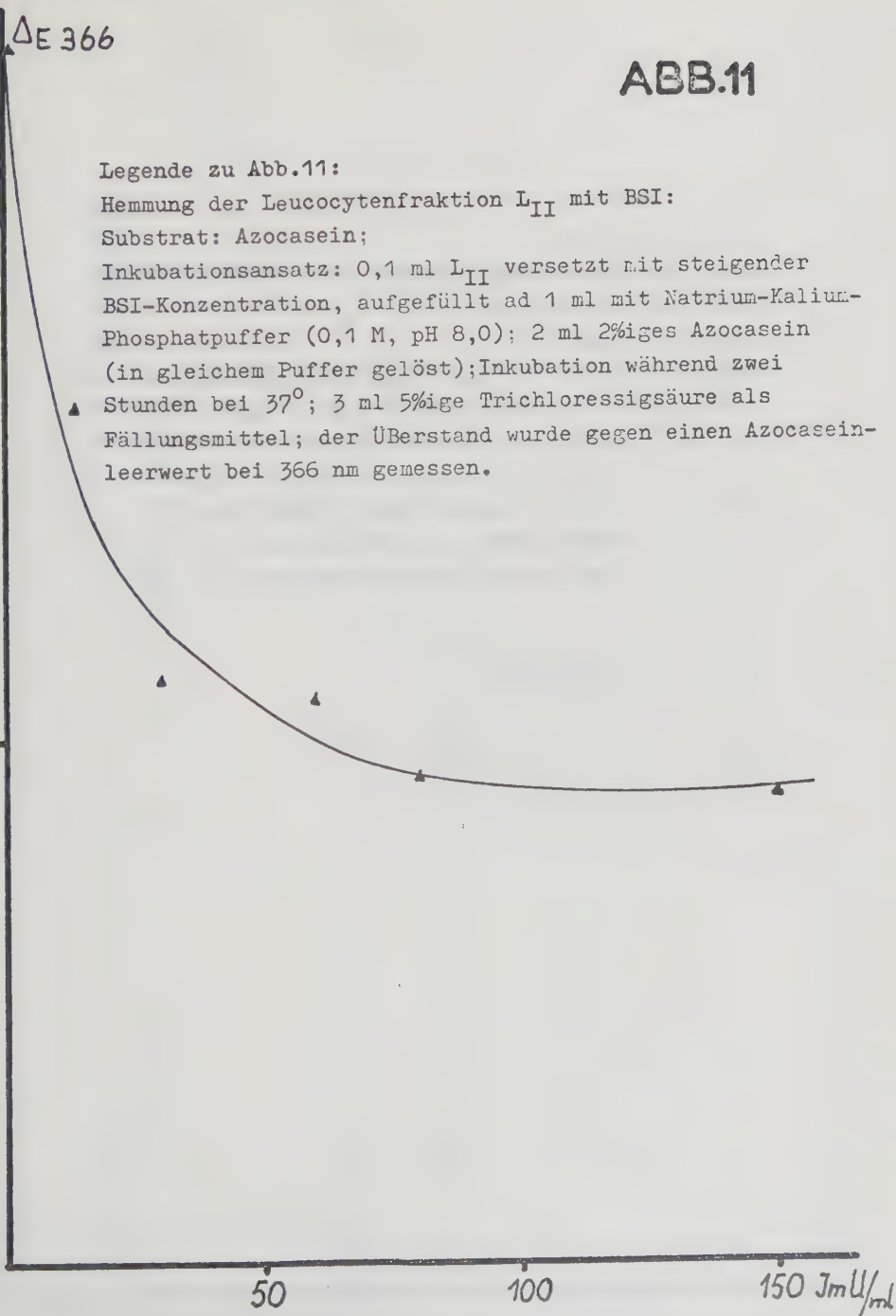
2-

0,1-

50

100

150 JmU/ml



Legende zu Abb.12:

Hemmung von Leucocytenproteasen mit pflanzlichen und tierischen Inhibitoren:

Substrat: Azocasein;

Inkubationsansatz: 0,1 ml Leucocytenhomogenat versetzt mit steigender Konzentration des jeweiligen Inhibitors, aufgefüllt ad 1 ml mit Natrium-Kalium-Phosphatpuffer (0,1 M, pH 8,0); 2 ml 2%iges Azocasein(in gleichem Puffer gelöst); Inkubation während einer Stunde bei 37°; 3 ml 5%ige Trichloressigsäure als Fällungsmittel; der Überstand wurde gegen einen Azocaseinleerwert bei 366 nm gemessen.

Kurve 1 mit dem Inh.: WB sauer

Kurve 2 mit dem Inh.: FB

Kurve 3 mit dem Inh.: WI

Kurve 4 mit dem Inh.: PNTI II (D)

Kurve 5 mit dem Inh.: HSMI

Kurve 6 mit dem Inh.: Trasylol

ABB.12

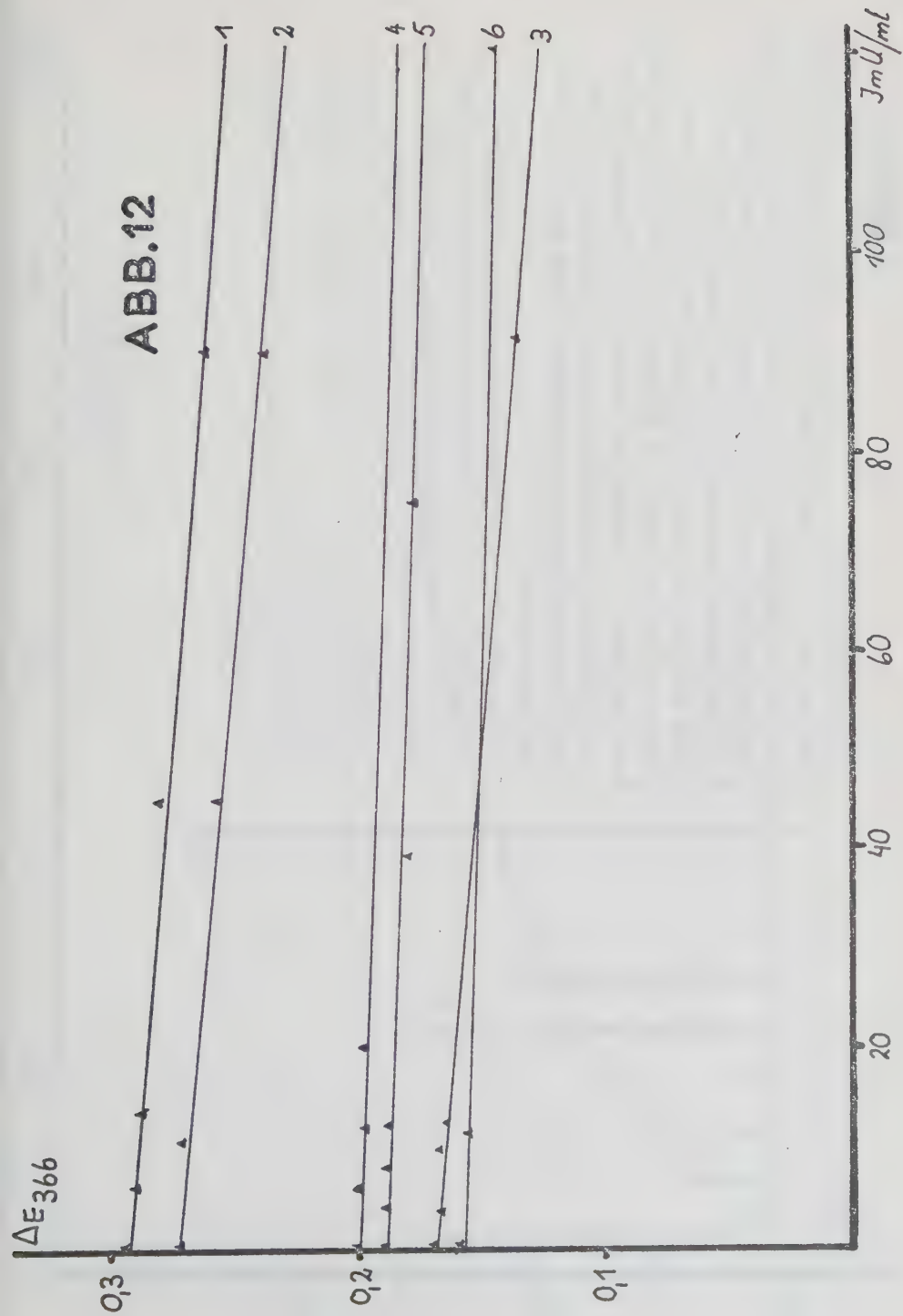


ABB.13

Legende zu Abb.13:

Hemmung von Leucocytenproteasen mit Humanserum:

Substrat: Azocasein;

Inkubationsansatz: 0,25 ml Leucocytenhomogenat versetzt mit steigender Konzentration von Plasma, aufgefüllt ad 1 ml mit Natrium-Kalium-Phosphatpuffer (0,1 M, pH 8,0); Vorinkubation 10 min; 2 ml 2%iges Azocasein (in gleichem Puffer gelöst); Inkubation während zwei Stunden bei 37° 3 ml 10%ige Trichloressigsäure als Fällungsmittel; der Überstand wurde gegen einen Leerwert von Azocasein bei 366 nm gemessen.

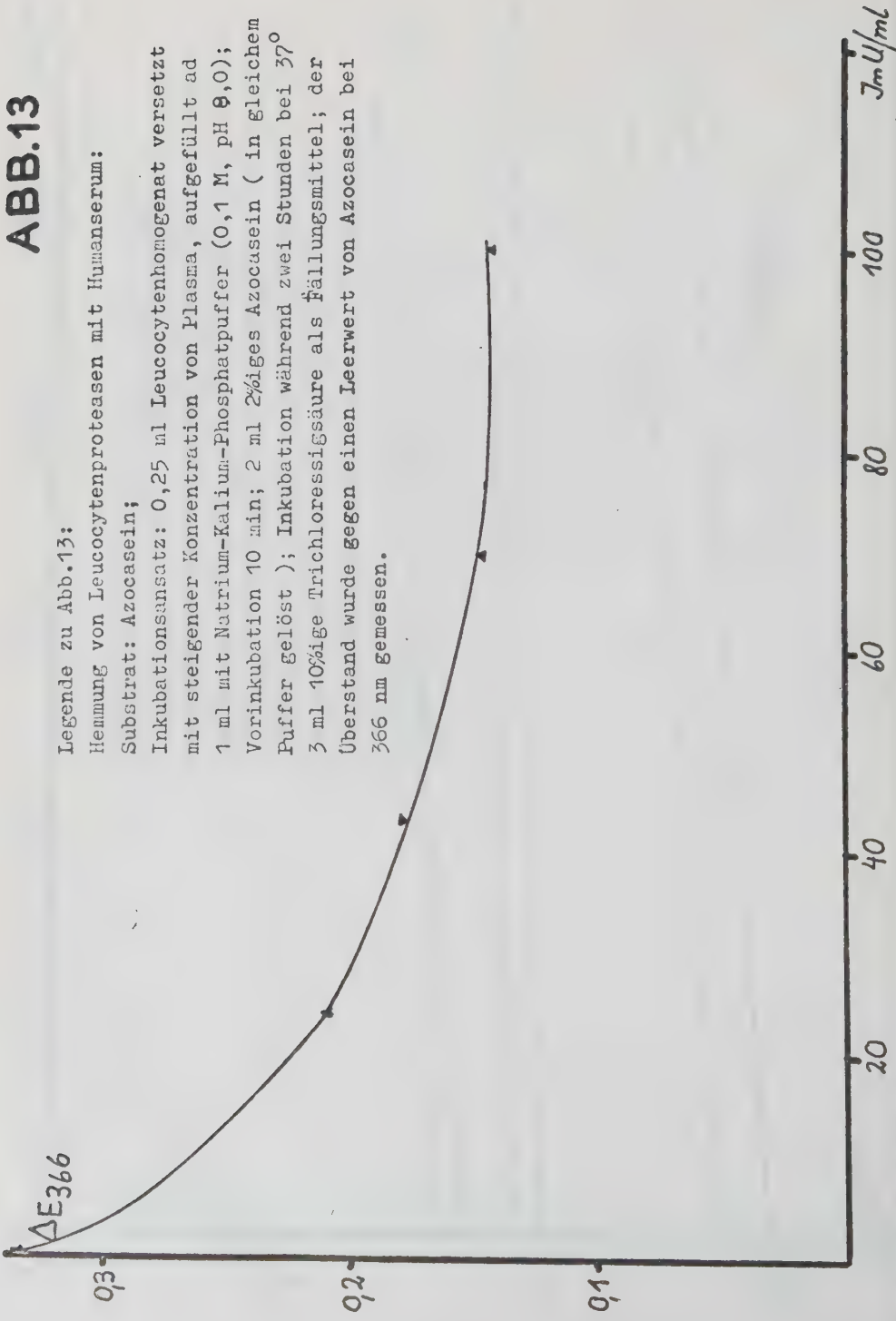


ABB.14

Legende zu Abb.14:

Proteolytischen Aktivität einzelner Ozaena-Nasensekrete:

Substrat: Azocasein

Inkubationsansatz: 0,2 ml Ozaena-Nasensekret; aufgefüllt

ad 1 ml mit Natrium-Kalium-Phosphatpuffer (0,1 M, pH 8,0);

2 ml 2%iges Azocasein (in glächem Puffer gelöst);

Inkubation während zwei Stunden bei 37°; 3 ml 5%ige Tri-

chloressigsäure als Fällungsmittel; der Überstand wurde

gegen einen Azocaseinleerwert bei 366 nm gemessen.

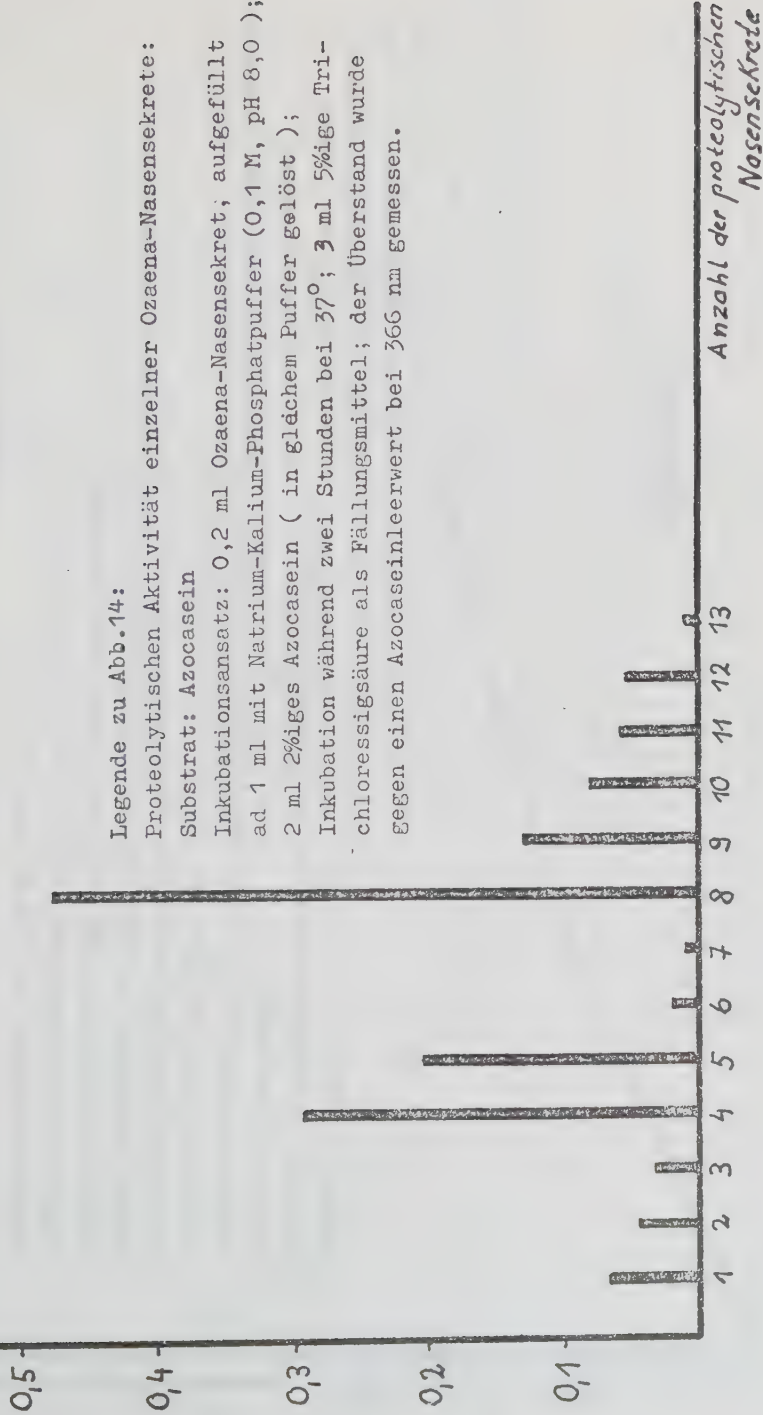


ABB.15

ΔE_{366}

0,4
0,3
0,2
0,1

0,4
0,3
0,2
0,1

0,4
0,3
0,2
0,1

4

8

12

16

20

24

28

32

JmU/ml

Legende zu Abb.15:

Hemmung von Ozaena-Nasensekret mit konzentriertem NSI:

Substrat: Azocasein;

Inkubationsansatz: 0,2 ml Ozaena-Nasensekret versetzt mit

steigender Konzentration von NSI, aufgefüllt ad 1 ml mit

Natrium-Kalium-Phosphatpuffer (0,1 M, pH 8,0); 2 ml

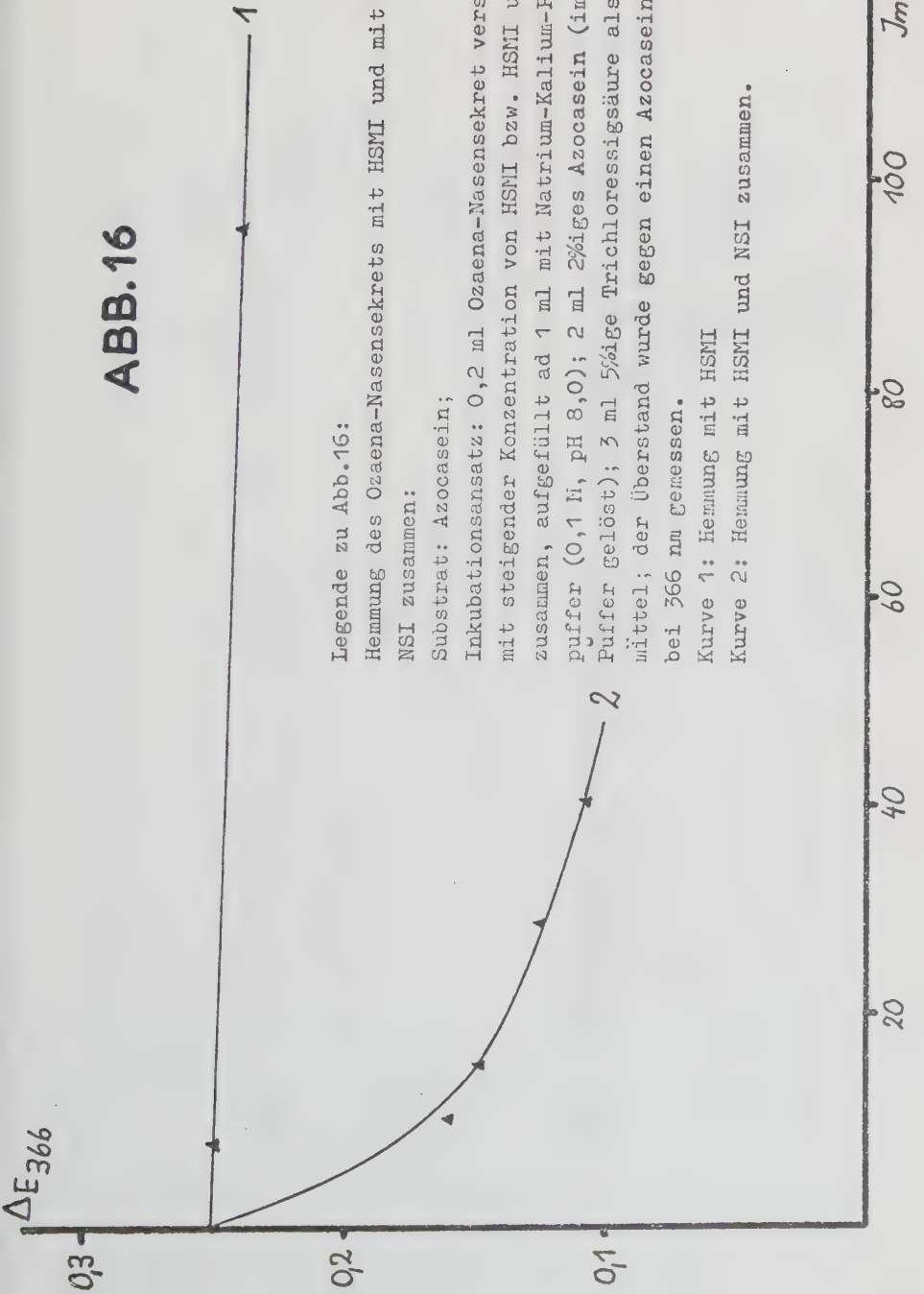
2%iges Azocasein (im gleichen Puffer gelöst); Inkubation

während zwei Stunden bei 37°; 3 ml 5%ige Trichloressig-

säure als Fällungsmittel; der Überstand wurde gegen einen

Azocaseinleerwert bei 366 nm gemessen.

ABB.16



Legende zu Abb.16:

Hemmung des Ozaena-Nasensekrets mit HSMI und mit HSMI und NSI zusammen:

Substrat: Azocasein;

Inkubationsansatz: 0,2 ml Ozaena-Nasensekret versetzt

mit steigender Konzentration von HSMI bzw. HSMI und NSI

zusammen, aufgefüllt ad 1 ml mit Natrium-Kalium-Phosphat

puffer (0,1 M, pH 8,0); 2 ml 2%iges Azocasein (im gleichen

Puffer gelöst); 3 ml 5%ige Trichloressigsäure als Fällungs-

mittel; der Überstand wurde gegen einen Azocaseinleerwert

bei 366 nm gemessen.

Kurve 1: Hemmung mit HSMI

Kurve 2: Hemmung mit HSMI und NSI zusammen.

TABELLE

Geschlecht	Alter	Raucher	ImU/mg Protein
1 männlich	9	nein	21,6
2 "	11	"	14,2
3 "	17	"	15,0
4 "	18	ja	37,5
5 "	19	"	5,1
6 "	22	"	48,0
7 "	21	"	56,6
8 "	21	"	8,0
9 "	23	nein	45,3
10 "	24	ja	18,2
11 "	29	nein	20,0
12 "	36	ja	50,0
13 "	37	"	25,7
14 "	43	"	0
15 "	43	"	8,0
16 "	48	nein	19,0
17 "	49	"	6,1
18 "	50	"	5,5
19 "	50	ja	15,2
20 "	52	"	9,8
21 "	60	"	15,2
22 "	62	"	5,9
23 "	66	"	2,7
24 "	81	"	3,0
25 "	?	"	1,0 laryngektomiert
26 "	?	nein	26,0 "
27 "	?	"	23,5 "

TABELLE

Geschlecht	Alter	Raucher	ImU/mg Protein
28 männlich	?	nein	12,0 laryngektomiert
29 "	?	"	0,3 "
30 "	?	"	15,2 "
31 "	?	"	8,1 "
32 weiblich	8	nein	4,5
33 "	11	"	7,3
34 "	33	"	19,2
35 "	34	"	36,0
36 "	37	ja	9,2
37 "	39	nein	3,8
38 "	35	"	24,0
39 "	40	"	32,8
40 "	41	"	7,1
41 "	42	"	10,8
42 "	48	"	19,0
43 "	53	"	21,6
44 "	65	"	20,6
45 "	62	"	12,4
46 "	?	"	5,3 laryngektomiert
47 "	?	"	6,1 "
48 "	?	"	29,0 "
49 "	?	"	11,4 "
50 "	?	"	19,0 "

3.1 Fraktionierung und Aktivitätsbestimmung des Leucocytenhomogenats

Nach Abb. 1 gelingt mittels Gelfiltration an Sephadex G-100 eine Aufteilung der proteolytischen Aktivität des Leucocytenhomogenats in drei Fraktionen L_I , L_{II} und L_{III} . Die proteolytische Gesamtaktivität der eingesetzten Leucocyten verteilt sich zu 65% auf L_I , zu 32,5% auf L_{II} und zu 2,5% auf L_{III} (s. Abb. 2).

Eine Messung der proteolytischen Wirkung bei verschiedenen pH-Werten von pH 5 - pH 8,5 ergibt ein Maximum bei pH 8,0 (s. Abb. 3), so daß weitere Versuche nur in diesem pH-Bereich durchgeführt werden.

3.2 Hemmbarkeit der Leucocytenproteasen durch Nasensekret-Inhibitor

Die mit steigender NSI-Konzentration versetzten Leucocytenproteasen ergeben eine Kurve, die die proteolytische Aktivität der Leucocytenproteasen in Abhängigkeit von der NSI-Konzentration zeigt. Nach Abb. 4 liegt die erreichbare Hemmung der proteolytischen Aktivität in der Größenordnung von ungefähr 70%, die auch mit überschüssigem NSI nicht überschritten werden kann. Die bei verschiedenen pH-Werten durchgeführten Hemmversuche führen zu dem gleichen Ergebnis, was dem annähernd parallelen Kurvenverlauf in Abb. 4 zu entnehmen ist.

Eine Übersteigung der 70%-Grenze kann erreicht werden mit Leucocytenfraktionen, die eine angereicherte proteolytische Aktivität aufweisen und frei sind von durch NSI nicht hemmbaren Bakterienproteasen. Die mit NSI durchgeführten Hemmversuche der Fraktionen ergeben für L_I einen Hemmgrad von 95% und für L_{II} einen von ungefähr 75%. Aufgrund der geringer proteolytischen Aktivität der Fraktion L_{III} (2,5%) scheidet diese für weitere Versuche aus (s. Abb. 5 u. Abb. 6). Ein temporäres Hemmverhalten des NSI ist nicht feststellbar.

3.3 Hemmbarkeit der Leucocytenproteasen durch Bronchialsekret-Inhibitor (BSI)

Die Untersuchung des von 50 Patienten gewonnenen Bronchialsekrets ergab das Vorhandensein antiproteolytischer Wirkung. Dabei beträgt der durchschnittlich sezernierte Inhibitorspiegel des Bronchialsekrets etwa 10 IU/mg Protein (s.Tab.).

Durch Gelfiltration des Bronchialsekrets an Sephadex G-75 erhält man an zwei Stellen des Elutionsdiagramms antitryptische Wirkung (s. Abb. 7). Von den zwei inhibitorhaltigen Fraktionen stellt I_I den höhermolekularen Anteil (MG etwa 60.000), I_{II} den niedermolekularen Anteil (MG etwa 13.000) dar. Anteilsmäßig sind in I_I 30%, in I_{II} etwa 70% der gesamten eingesetzten inhibitorischen Aktivität vorhanden.

Der immunoelektrophoretische Nachweis von α_1 - Antitrypsin in Fraktion I_I des Bronchialsekrets (s. Abb. 8) beweist, daß die in Fraktion I_I nachgewiesene Hemmung von α_1 - Antitrypsin bewirkt wird. Nur 50% der antitryptischen Wirkung im Bronchialsekret ist also auf Serum-inhibitoren rückführbar.

Durch Perchlorsäurebehandlung des Bronchialsekrets werden Serum-inhibitoren ausgefällt. Die Gelfiltration säurebehandelten Bronchialsekrets zeigt nur eine inhibitorhaltige Fraktion im Elutionsbereich von Proteinen mit dem Molekulargewicht von 13.000 (s. Abb. 9). Dieses beweist die Existenz eines säurestabilen Inhibitors mit dem MG von ungefähr 13.000, der wahrscheinlich von dem Flimmerepithel der Bronchialschleimhaut selbst sezerniert wird.

Die mit BSI durchgeführten Hemmversuche der Leucocytenfraktionen L_I und L_{II} ergeben in etwa gleiche Kurvenverläufe und gleiche Hemmgrade (95% bzw. etwa 70%) wie bei den mit NSI durchgeführten Versuchen (s. Abb. 10 und Abb. 11). Wie bei NSI ist auch bei BSI kein temporäres Hemmverhalten nachweisbar.

Eigenschaften, Wirkungs- und Verhaltensweisen der beiden Inhibitoren lassen den Schluß zu, daß BSI dem NSI zumindest analog, wenn nicht gar gleich ist.

3.4 Hemmbarkeit leucocytärer Proteasen durch verschiedene Inhibitoren

Die Versuche zur Hemmung leucocytärer Proteasen mit pflanzlichen Inhibitoren, isoliert aus weißen Wollen, WB sauer, Feuerbohnen, FI (5), Weizen, WI (6) und Erdnüssen, PNTI D II (7) verlaufen negativ. Ebenso kann mit tierischen Inhibitoren isoliert aus Hundesubmandibularisdrüsen, HSMI (8) und ein von Frey und Werle isolierter intrazellulärer, polyvalenter Trypsin-Kallikrein-Inhibitor aus Rinderorganen (Trasylol) keine Hemmung erzielt werden (s. Abb. 12).

Die mit Humanplasma durchgeführte Hemmung leucocytärer Proteasen zeigt, daß Serumproteine in der Lage sind, die proteolytische Aktivität bis zu 50% zu hemmen (s. Abb. 13).

3.5 Chemische Struktur des aktiven Zentrums leucocytärer Proteasen

Die Untersuchung des aktiven Zentrums leucocytärer Proteasen erfolgt auf indirektem Wege durch Veränderung am aktiven Zentrum mittels definierten Umsetzungen. Die Prüfung leucocytärer Proteasen auf Trypsin- bzw. Chymotrypsinähnlichkeit verläuft negativ. Der Nachweis wird geführt durch den veränderten Trypsin- bzw. Chymotrypsintest und mit Diisopropylfluor-phosphat (DFP). Danach scheinen Leucocytenproteasen keinen Serinrest im aktiven Zentrum zu besitzen.

Den gleichen negativen Verlauf zeigt die Prüfung der leucocytären Proteasen auf Kathepsinähnlichkeit. Diese wird durchgeführt mit Glutathion zum Nachweis essentieller SH-Gruppen im aktiven Zentrum und mit Mercaptoäthanol zum Nachweis von Metallionen als Cofaktoren. Demnach scheinen im Leucocyten-gemisch keine größeren Mengen aus Lysosomen freigesetzten Kathepsine vorhanden zu sein.

3.6 Proteolytisch wirksames Nasensekret (Ozaena) als Spezialfall

In dem Nasensekret von Ozaena-Patienten ist keine inhibitorische Aktivität mehr feststellbar. Eine Säurebehandlung weist nach, daß auch kein durch Leucocytenproteasen 'maskierter' Inhibitor vorhanden ist. Aus Abb. 14 ist ersichtlich, daß in solchen Nasensekreten proteolytische Aktivität auftreten kann, die auf vorhandene Leucocyten- und Bakterienproteasen zurückzuführen ist.

Die proteolytische Wirkung solch pathologischen Nasensekrets kann durch konzentrierten MSI aus normalem Nasensekret bis etwa 50% gehemmt werden (s. Abb. 15). Ein Versuch zur Hemmbarkeit der Restaktivität mit HSMI fällt negativ aus (s. Abb. 16).

4. Beschreibung der Versuche

Unter Punkt 5.23 wird dargestellt, wie das für die Versuche erforderliche Leucocytenhomogenat gewonnen wird. Zur Erzielung einer höheren Aktivität der leucocytären Proteasen, bedarf es einer anderen Aufarbeitung des Rohmaterials.

4.1 Voraussetzungen für die Untersuchungen der Hemmungen leucocytärer Proteasen

4.11 Konzentration und Auftrennung der leucocytären Proteasen

Der von Patienten gewonnene 'Eiter' wurde mit destilliertem Wasser im Zellhomogenisator aufgeschlossen und anschließend lyophilisiert. Von dem so erhaltenen Pulver wurde jeweils 1 g in 20 ml Boratpuffer (0,05 M, pH 8,0) gelöst, das Gemisch nochmals kurz homogenisiert und danach hochtourig 1 Stunde lang zentrifugiert ($U = 6.000$). Den Überstand benutzte man zur weiteren Aufarbeitung.

Mittels der Gelfiltration an Sephadex G-100 (s. 5.24) gelingt eine Aufteilung der proteolytischen Aktivität in die drei Fraktionen L_I , L_{II} und L_{III} (s. Abb. 1). Die proteolytische Aktivität in den so erhaltenen Fraktionen wurde mit Azocasein als unspezifisches Substrat für Proteasen bestimmt (s. 5.413). Von diesen drei Fraktionen wies L_I das größte Molekulargewicht auf. Jede der drei Leucocyten-Fraktionen wurde zur Entsalzung in einen Dialyseschlauch gefüllt, erst in fließendes Wasser und dann in Aqua dest. gehängt (s. 5.33), um dann lyophilisiert (5.34) zu werden.

4.12 Aktivitätsbestimmung in den Leucocyten-Fraktionen

Jede der lyophilisierten Leucocyten-Fraktionen wurde in 2 ml Boratpuffer (0,05 M, pH 8,0) aufgelöst. Von dieser Lösung wurde je 0,1 ml zur Aktivitätsbestimmung verwendet. Die Messung erfolgt wieder mit dem Substrat Azocasein (s. 5.413). Es ergab sich, daß L_I 65%, L_{II} 32,5% und L_{III} 2,5% der proteolytischen Gesamtaktivität der eingesetzten Leucocytenproteasen enthielten (s. Abb. 2).

4.13 Aktivitätsbestimmung des Leucocytenhomogenats bei verschiedenen pH-Werten

Proteolytische Wirkung des Leucocytenhomogenats ist in einem weiten Bereich von pH 5 - pH 8,5 nachweisbar. Aufgezeigt wurde dies durch Spaltung des Substrats Azocasein (s. 5.413). Wie Abb. 3 zeigt, liegt das Maximum der proteolytischen Aktivität deutlich bei pH 8,0. Daher wurden auch weitere Versuche mit Leucocytenproteasen bei pH 8,0 durchgeführt.

4.2 Hemmung der Leucocytenproteasen durch Nasensekret-Inhibitor (NSI)

4.21 Hemmung leucocytärer Proteasen durch NSI bei verschiedenen pH - Werten

Aus der im Arbeitskreis Hochstraßer gefundenen Hemmwirkung des im Flimmerepithel der Nasenschleimhaut produzierten Inhibitors gegenüber Trypsin, Chymotrypsin und Pronase läßt sich keine physiologische Funktion des Inhibitors ableiten (12). Es ergab sich nun die Frage nach der eigentlichen Funktion des Inhibitors im Bereich des Nasenraumes. Es ist bekannt, daß es bei Rhenitiden zum Austritt von Leucocyten aus dem Nasenraum kommt. Leucocyten enthalten jedoch erhebliche Mengen von Proteasen, die beim Zerfall freigesetzt werden. Es wurde daher untersucht, ob etwa der NSI in der Lage ist, leucocytäre Proteasen zu hemmen.

Die Leucocytenhomogenate wurden mit NSI versetzt. Die proteolytische Wirkung dieses Gemisches zeigte eine erhebliche Aktivitätsverminderung gegenüber aliquoten von NSI-freien Homogenat.

Um die erreichbare Hemmung leucocytärer Proteasen zu bestimmen, wurden zu einer gleichbleibenden Proteasemenge steigende Inhibitor-Konzentrationen gegeben. Die graphische Darstellung dieses Vorgehens führte zu einer Kurve, welche die proteolytische Aktivität der Leucocytenproteasen in Abhängigkeit von der NSI-Konzentration zeigt. Die erreichbare Hemmung der proteolytischen Aktivität liegt in der Größenordnung von ungefähr 70% (s. Abb. 4). Ein größerer Hemmgrad des Leucocytenhomogenats mit überschüssigem NSI zu erzielen, war nicht möglich.

Wie unter 4.13 beschrieben, war proteolytische Aktivität der Leucocytenproteasen in einem weiten pH - Bereich feststellbar. Es wurde versucht, Hemmungen leucocytärer Proteasen bei verschiedenen pH - Werten durchzuführen und das entsprechende Hemmverhalten zu messen und zu vergleichen.

Abb. 4 zeigt vier unter gleichen Versuchsbedingungen erstellte Hemmkurven leucocytärer Proteasen mit NSI jeweils bei einem anderen pH - Wert. Der annähernd parallele Verlauf der Kurven läßt auf ein gleiches Hemmverhalten der Leucocytenproteasen bei verschiedenen pH - Werten schließen. Die Intensität der Hemmung überschreitet in keinem Fall 70%.

4.22 Hemmung der leucocytären Fraktionen mit NSI

Das Ergebnis von 4.21 zeigt, daß der Hemmgrad des Leucocytenhomogenats auf 70% begrenzt ist. Zwangsläufig stellte sich die Frage, ob die Grenze als definitiv anzusehen ist.

Mit den in den vorausgehenden Versuchen verwendeten Konzentrationen NSI und Leucocytenhomogenat konnte diese Grenze nicht überschritten werden. Leucocytenhomogenate aus Eiter sind sehr wahrscheinlich mit bakteriellen Proteasen verunreinigt. Bakterienproteasen sind jedoch durch NSI nicht hemmbar. Die in den Leucocytenhomogenaten gefundene, nicht hemmbare proteolytische Aktivität wird auf solche zusätzliche Proteasen zurückgeführt. Zur Beantwortung der Frage wurde versucht, die proteolytische Aktivität der Leucocytenhomogenate anzureichern und zu reinigen. Bei der Gelfiltration (s. 5.24) konnte eine Auftrennung der proteolytischen Aktivität in drei Fraktionen erreicht werden. Mit diesen drei Leucocytenfraktionen wurde das Experiment der Hemmung von Leucocytenproteasen mit NSI wiederholt. Es ergab sich, daß mit der Hauptfraktion ein Hemmgrad erreichbar ist wie mit reinem Trypsin bzw. Chymotrypsin.

Nach Abb. 5 wies L_I einen Hemmgrad von 95% und L_{II} einen Hemmgrad von ungefähr 75% auf. In der niedermolekularen Fraktion L_{III} dagegen konnte keine Hemmung erhalten werden (s. Abb. 6). Allerdings enthielt L_{III} auch nur 2,5% der

Gesamtaktivität der Proteasen und war somit für Untersuchungen wegen zu geringer proteolytischer Aktivität nicht verwendbar. Die beschriebene Hemmung der drei Leucocytenfraktionen wurde mit konzentriertem NSI durchgeführt. Für die Proteasenbestimmung selbst wurde Azocasein verwendet (s. 5.413).

4.23 Temporäre Hemmung leucocytärer Proteasen mit NSI

Bei dem Versuch, ob der NSI auch zu den temporären Inhibitoren zu zählen ist, wurden Leucocytenproteasen mit NSI versetzt. Dabei müßte das proteolytische Enzym den Inhibitor nach längerer Inkubationszeit spalten. Dieser Vorgang wäre durch Verlust der Hemmwirkung nachweisbar.

Bei dieser Untersuchung ließ man NSI auf Leucocytenhomogenat verschieden lang einwirken. Nach Enteiweißung wurde im neutralisierten Überstand die noch vorhandene Inhibitor-menge gegen Trypsin bestimmt. (s. 5.411). Der NSI war auch nach 12 Stunden nicht proteolytisch gespalten worden, so daß er nicht zu den temporären Hemmstoffen gezählt werden kann.

4.3 Hemmung der Leucocytenproteasen durch Bronchialsekret-Inhibitor (BSI)

4.31 Berechtigung der Frage nach BSI

Nach bisherigen Ergebnissen könnte gegebenenfalls dem NSI durch die Hemmung leucocytärer Proteasen im Nasenraum eine wichtige physiologische Schutzfunktion zugeschrieben werden. Wegen der einheitlichen Auskleidung der oberen Luftwege mit Flimmerepithel wäre das Vorhandensein eines ähnlich wirk-samen Hemmstoffes im Bronchialbereich physiologisch gesehen sinnvoll und demnach auch denkbar.

4.32 Nachweis von inhibitorischer Aktivität im Bronchialsekret

Das gewonnene Bronchialsekret (5.22) wurde zum Homogenat verarbeitet. Mittels Trypsinhemmtest (s. 5.411) konnte das Vorhandensein erheblicher antiproteolytischer Wirkung nachgewiesen werden. Durch Untersuchung des Bronchialsekrets von 50 Patienten (s. Tabelle) zeigte sich, daß der durchschnittlich sezernierte Inhibitorspiegel des Bronchialsekrets pro Patient etwa 18 ImU/mg Protein betrug, was dem nachgewiesenen durchschnittlichen NSI-Spiegel von ebenfalls etwa 18 ImU/mg pro Patient entsprach (13).

4.33 Nachweis von α_1 -Antitrypsin im Bronchialsekret

Bekannterweise erscheinen die meisten Proteine des Blutserums auch im Bronchialsekret, darunter vor allem α_1 -Antitrypsin. Die Schutzfunktion des Bronchialsekrets Infektionen gegenüber wurde bisher allein auf das darin vorhandene inhibitorische wirksame α_1 -Antitrypsin Leucocyten und Bakterienproteasen gegenüber zurückgeführt.

Der Nachweis von α_1 -Antitrypsin im Bronchialsekret wurde immunoelektrophoretisch mit Anti- α_1 -Antitrypsin von Kaninchen als Antiserum (s. 5.42) geführt (s. Abb. 8). Es stellte sich die Frage, ob die gefundene Hemmung nicht auch auf andere Faktoren als nur auf der antiproteolytischen Wirkung diffundierter Serumproteine beruhen würde.

Für die Untersuchung wurde von intubierten Patienten gewonnenes und konzentriertes Sekret durch Gelfiltration an Sephadex G-75-medium fraktioniert (s. 5.24). Abb. 7 zeigt, daß an zwei Stellen des Eluationsdiagramms antitryptische Wirkung vorhanden ist. Es ergeben sich zwei verschiedenen molekulare Anteile von BSI, die mit I_I und I_{II} bezeichnet wurden. Diese inhibitorhaltigen Fraktionen jeden Anteils wurden vereinigt, durch Druckdialyse entsalzt (s. 5.33) und gefriergetrocknet (s. 5.34).

I_I stellt dabei den Anteil inhibitorischer Aktivität dar, der im Bereich höhermolekularer (MG etwa 60.000), I_{II} dagegen den Anteil der im Bereich niedermolekularer Stoffe (MG etwa 13.000) liegt. Anteilmäßig waren in I_I etwa 30%, in I_{II} etwa 70% der gesamten inhibitorischen Aktivität vorhanden. I_I zu I_{II} verhielt sich somit ungefähr wie 1 zu 2.

Da α_1 -Antitrypsin ein hohes Molekulargewicht (ca 45.000) besitzt, liegt die Vermutung nahe, daß die in der höhermolekularen Fraktion I_I vorhandene antiproteolytische Wirkung auf im Bronchialsekret vorhandene Seruminhibitoren zurückzuführen ist. Damit wären ungefähr 30% der antitryptischen Wirkung des Bronchialsekrets auf Seruminhibitoren rückführbar, nicht dagegen die restliche inhibitorische Aktivität von ungefähr 70%, die im niedermolekularen Bereich auftritt. Dieser niedermolekulare Inhibitoranteil I_{II} würde sich aufgrund des Molekulargewichts von 13.000 als ein dem NSI analoger Hemmstoff erweisen.

4.34 Säurebehandlung des Bronchialsekrets

Größere Sekretmengen wurden von laryngektomierten Patienten gewonnen und für weitere Aufarbeitung konzentriert (s. 5.3). Nach der Behandlung in der Druckdialysekammer (s. 5.32), in der das Material unter intensivem Rühren eingeeengt wurde, zeigte das Konzentrat keine antitryptische Wirkung mehr. Aller Wahrscheinlichkeit nach waren während dieses Vorgangs die im Sekret laryngektomierter Patienten immer vorhandenen Leucocyten zerstört und dadurch proteolytische Enzyme freigesetzt worden. Es lag die Vermutung nahe, daß die Inhibitoren mit diesen Proteasen einen Komplex bilden und damit inaktiviert würden. Danach läge der Inhibitor in gebundenem Zustand vor.

Durch eine Denaturierung der Proteasen müßte bei Gültigkeit dieser Annahme der Inhibitor aus der Komplexbildung wieder freigesetzt werden können. Diese Enteiweißung kann mit 5%iger Perchlorsäure durchgeführt werden, welche die im Bronchialsekret vorhandenen Proteine, Leucocyten- und Bakterienproteasen auszufällen vermag (s. 5.31).

Nach der Säurebehandlung war die inhibitorische Wirkung des Bronchialsekrets Trypsin gegenüber wieder nachweisbar. Allerdings mußte angenommen werden, daß im Sekret vorhandenes α_1 -Antitrypsin irreversibel zerstört wurde. Somit wäre eine Verminderung der inhibitorischen Aktivität des Bronchialsekrets um 30% zu erwarten. Das Gegenteil trat ein. Die nach der Säurebehandlung im Bronchialsekret auftretende inhibitorische Aktivität war größer als zuvor. Offensichtlich setzt die Behandlung mit Perchlorsäure bereits in situ vorhandene, durch Leucocyten- und Bakterienproteasen gebundene und damit inaktive Inhibitoren frei, wodurch die Erhöhung der inhibitorischen Aktivität erklärt werden könnte.

Das Wiederauftreten proteolytischer Wirkung läßt sich auf das Vorhandensein eines relativ säurestabilen Hemmstoffs zurückführen, der als ein in der Bronchialschleimhaut direkt sezernierter Inhibitor anzusehen ist. Es zeigte sich nur eine inhibitorhaltige Fraktion im Elutionsbereich von Proteinen mit einem Molekulargewicht von 13.000 (s. Abb.9).

4.35 Hemmung der Leucocytenfraktionen L_I und L_{II} durch BSI bei verschiedenen pH - Werten

Mit dem so gewonnenen BSI-Konzentrat wurde eine Hemmung der Leucocytenfraktionen L_I und L_{II} durchgeführt. Zu gleichbleibenden Mengen von Leucocytenkonzentrat wurden steigende BSI-Konzentrationen hinzugefügt. Die bei pH 8,0 aufgestellten Hemmkurven (s. Abb. 10 und Abb. 11) zeigten in etwa den gleichen Verlauf, wie die mit NSI erhaltenen

(s. 4.21 bzw. 4.22). Sie weisen somit auf ein gleiches Hemmverhalten leucocytärer Proteasen mit NSI und mit BSI hin.

4.36 Temporäre Hemmung leucocytärer Proteasen mit BSI

Der unter 4.23 geschilderte Versuch der temporären Hemmung leucocytärer Proteasen mit NSI wurde unter gleichen Versuchsbedingungen mit BSI wiederholt. Auch hier stellte sich keine proteolytische Spaltung des Inhibitors ein, so daß der BSI ebenfalls nicht zu den temporären Hemmstoffen gezählt werden kann.

4.4 Hemmung leucocytärer Proteasen durch verschiedene Inhibitoren

Inhibitoren des menschlichen Flimmerepithels der oberen Luftwege vermögen leucocytäre Proteasen unter Komplexbildung zu inaktivieren. Macht man diese Inhibitoren mitverantwortlich für die Aufrechterhaltung des physiologischen Gleichgewichts im Bereich der oberen Luftwege, wäre jede pathologische Entgleisung durch Verminderung oder sogar durch Ausfall der Inhibitorwirkung infolge Komplexbildung mit leucocytären Proteasen verursacht.

Eine von außen gesteuerte Beeinflussung des Inhibitorspiegels läge im Interesse der Medizin. Zwangsläufig ergibt sich die Frage nach der Substituierbarkeit der Inhibitoren durch gleichwirksame, leicht gewinn- und verwertbare Hemmstoffe, die pflanzlicher, tierischer oder menschlicher Natur sind. Um diesen Effekt gegebenenfalls zu erreichen, wurden solche Inhibitoren auf ihre hemmende Wirkung leucocytären Proteasen gegenüber geprüft.

4.41 Pflanzliche Inhibitoren

Als pflanzliche Inhibitoren wurden Hemmstoffe aus weißen Bohnen (WB sauer), Feuerbohnen (FI), Weizen (WI) und Erdnüssen (PNTI D II) verwendet. Bei den Hemmversuchen wurden Leucocytenproteasen mit diesen Stoffen versetzt und die proteolytische Aktivität Azocasein gegenüber gemessen (s. 5.413). Abb. 12 zeigt, daß keine Hemmung zustandekam, d.h. Leucocytenproteasen werden in ihrer Wirksamkeit durch die verwendeten Inhibitoren nicht eingeschränkt.

4.42 Tierische Inhibitoren

Als tierische Hemmstoffe wurden ein aus Hundesubmandibularisdrüsen isolierter Hemmstoff (HSMI) und ein von Frey und Werle isolierter intrazellulärer, polyvalenter Trypsin-Kallikrein-Inhibitor aus Rinderorganen, der unter dem Handelsnamen Trasylol bekannt ist, verwendet. Auch hier verliefen sämtliche Versuche, den oben angegebenen Zweck zu erreichen, negativ, d.h. es konnte praktisch keine Hemmung der Leucocytenproteasen erreicht werden (s. Abb. 12).

4.43 Plasmainhibitoren

Bekannterweise sind im Humanplasma vorhandene Proteine in der Lage, Leucocyten- und Bakterienproteasen zu hemmen. Daher wird ihnen vor allem eine Schutzfunktion bei Infektionen zugeschrieben.

Um die Hemmwirkung der im Flimmerepithel der oberen Luftwege produzierten Hemmstoffe (NSI und BSI), mit derjenigen der Plasmainhibitoren vergleichen zu können, wurde die Hemmung von Leucocytenproteasen mit Serum-inhibitoren durchgeführt.

In der Hemmreihe wurde als Enzym Leucocytenhomogenat mit Seruminhibitoren in steigender Konzentration versetzt. Als Quelle der Seruminhibitoren diente Humanplasma. Die so behandelten Leucocyten ließ man auf Azocasein, als unspezifisches Proteasensubstrat, einwirken (s. 5.413). Die Spaltprodukte von Azocasein waren wegen einer erheblichen Trübung der Lösung im Eppendorf-Photometer nicht meßbar. Ursache der Trübung waren die im Serum vorhandenen hochmolekularen Proteine, die durch 10%ige Trichloressigsäure ausgefällt werden mußten, da die im Versuch verwendete 5%ige Trichloressigsäure sie nicht zu fällen vermochte. Erst nach dieser Behandlung ergaben sich die meßbaren Werte.

Abb. 13 zeigt, daß Seruminhibitoren in der Lage sind, Leucocytenproteasen zu hemmen wie Sekretinhibitoren, d.h. die Hemmkurven laufen parallel. Der maximal erreichbare Hemmgrad der Leucocytenproteasen lag nur bei ungefähr 50%. Damit scheinen NSI und BSI effizienter als Plasmainhibitoren zu sein.

4.5 Chemische Untersuchungen der Struktur des aktiven Zentrums leucocytärer Proteasen

Enzyme sind aufgrund ihrer aktiven Zentren fähig, spezifisch wirksam zu werden. Um Leucocytenproteasen näher charakterisieren zu können, ist es notwendig, deren aktive Zentren zu untersuchen. Eine solche Untersuchung wäre möglich über die direkte Erschließung deren chemischer Struktur. Da sich dieser Weg äußerst schwierig gestaltet, wird auf andere indirekte Methoden zurückgegriffen.

Eine Methode besteht darin, ähnliche Wirkungsweisen anderer, schon erforschter und chemisch aufgeschlossener Enzyme nachzuahmen. Würden sich dabei ähnliche Reaktionen einstellen, könnte man aus dieser Tatsache eventuell auf ein gleiches aktives Zentrum schließen. Eine weitere Methode besteht in der Hemmung des aktiven Zentrums, die eine

Inaktivierung des Enzyms bewirkt. Solche Veränderungen am aktiven Zentrum werden durch definierte Umsetzungen erreicht.

4.51 Prüfung leucocytärer Proteasen auf einen Serinrest im aktiven Zentrum

4.511 Prüfung auf Trypsinähnlichkeit

Die Leucocytenproteasen sind wie die Protease Trypsin in schwachalkalischen Bereichen von pH 7 - pH 9,0 optimal wirksam. Aufgrund dieser gleichen pH - Abhängigkeit beider Enzyme wurde die Überlegung angestellt, ob nicht auch Leucocytenproteasen wie Trypsin spezifisch aus dem Substrat BAPA durch Spaltung p - Nitroanilid freizusetzen vermögen. Dabei müßte 1 μ g leucocytärer Proteasen eine Extinktionsänderung von 0,00332/min bewirken. Der Nachweis wurde nach der unter 5.411 beschriebenen Meßanordnung geführt mit dem einen Unterschied, daß Trypsin durch Leucocytenhomogenat ersetzt wurde. Hierbei ergab sich nach einer Ablesezeit von 5 Minuten keine Extinktionsänderung. Diese Tatsache läßt den Schluß zu, daß Leucocytenproteasen keine trypsinähnliche Wirkung aufweisen, d.h. die aktiven Zentren beider Enzyme scheinen nicht ähnlich zu sein.

4.512 Prüfung auf Chymotrypsinähnlichkeit

Die Protease Chymotrypsin setzt spezifisch aus SUPHEPA p - Nitroanilid frei. Wären Leucocytenproteasen in der Lage, dieses eben erwähnte Substrat zu spalten, könnte man daraus auf ein gleiches aktives Zentrum der beiden Enzyme Chymotrypsin und leucocytärer Proteasen schließen.

Dem Nachweis lagen die unter 5.512 beschriebenen Meßbedingungen zugrunde. Allerdings wurden statt Chymotrypsin Leucocytenhomogenat verwendet. Alle 10 Minuten wurden eine

Stunde lang die Extinktionen abgelesen. Eine Extinktionsänderung war nicht festzustellen, d.h. SUPHEPA war von Leucocytenproteasen nicht gespalten worden. Demnach scheinen Leucocytenproteasen keine Trypsinähnlichkeit aufzuweisen.

4.513 Prüfung durch Hemmung mit Diisopropyl - fluor - phosphat (DFP)

Enzyme mit einem Serinrest im aktiven Zentrum können durch Veresterung des Serin-OH spezifisch mit DFP gehemmt werden. Dadurch werden Proteasen inaktiv und weisen keine enzymatische Aktivität mehr auf.

Die mit 10^{-3} M DFP versetzten Leucocytenproteasen verloren auch nach 24 Stunden Einwirkzeit nicht ihre proteolytische Aktivität, deren Existenz vor und nach der Einwirkung von DFP mit dem Substrat Azocasein nachgewiesen wurde (s. 5.413). Die Höhe der proteolytischen Aktivität der Leucocytenproteasen war demnach konstant geblieben. Das Ergebnis legt nahe, daß Leucocytenproteasen keine Serinproteinasen sind.

Da die Versuche, eine Enzymähnlichkeit der Leucocytenproteasen mit den Serinproteinasen Trypsin und Chymotrypsin wie auch der Versuch einer chemischen Blockierung des aktiven Zentrums mit DFP negativ ausgefallen waren, darf angenommen werden, daß Leucocytenproteasen tatsächlich keinen Serinrest im aktiven Zentrum haben.

4.52 Prüfung der leucocytären Proteasen auf Kathepsinähnlichkeit

Zu der Gruppe der Endopeptidasen gehören neben Leucocytenproteasen auch Kathepsine, die in Lysosomen vorhanden sind. Es ist zu prüfen, ob leucocytäre Proteasen Ähnlichkeit mit Kathepsinen aufweisen.

4.521 Prüfung auf SH-Gruppen im aktiven Zentrum

Kathepsine gehören zur Gruppe der SH- Enzyme, die SH- Gruppen für ihre volle Wirksamkeit benötigen. Das SH-Reagens Glutathion vermag die SH-Gruppe durch H_2S -Bildung zu blockieren.

Für den Versuche wurde 1 mg Glutathion mit Leucocytenhomogenat gemischt und anschließend eine mögliche Hemmung der Leucocytenproteasen mit Azocasein (s. 5.413) geprüft. Es stellte sich kein Verlust an proteolytischer Aktivität durch Glutathionbehandlung ein.

4.522 Inaktivierungsversuche mit Komplexbildnern

Katheptische Proteasen benötigen teilweise Metallionen zur vollen Wirksamkeit. Mercaptoöthanol vermag Metallionen unter Komplexbildung zu binden. Wären Leucocytenproteasen ionenabhängig, müßte die proteolytische Wirkung solcher Enzyme aufgehoben werden.

In der Versuchsanordnung wurde eine mögliche Inaktivierung einer mit 0,2 ml Mercaptoöthanol versetzten Leucocytenlösung gemessen. Dabei diente Azocasein als Substrat (s. 5.413). Die proteolytische Aktivität des Leucocytenhomogenats vor und nach Mercaptoöthanolbehandlung war allerdings gleich groß. Damit war der Nachweis erbracht worden, daß Leucocytenproteasen keine metallionenabhängige Enzyme sind.

Aller Wahrscheinlichkeit nach sind im Leucocytenmisch keine aus Lysocomen freigesetzten Kathepsine vorhanden, weder solche mit SH-Gruppen noch solche mit zweiwertigen Metallionen im aktiven Zentrum.

4.6 Proteolytisch wirksames Nasensekret (Ozaena) als Spezialfall

4.61 Definition und Entstehungsursache Ozaena

Unter Ozaena (Stinknase) versteht man eine chronische Entzündung der Nase mit Atrophie der Nasenschleimhaut und Borkenbildung. Die bakterielle Zersetzung dieser Borken durch sogenannte Ozaena-Bakterien verursacht den Geruch. Infolge der Atrophie der Nasenschleimhaut kann kein NSI mehr produziert werden, es sei denn nur in sehr geringen Mengen, so daß im Nasensekret sogar proteolytische Aktivität auftritt.

4.62 Nachweis von proteolytischer Aktivität im Ozaena-Nasensekret

Das von Ozaena-Patienten untersuchte Nasensekret zeigte keine hemmende Wirkung gegenüber Trypsin oder Chymotrypsin. Bei Verwendung von Azocasein als unspezifisches Substrat (s. 5.413) wurde eine mehr oder weniger große Spaltung dieses Substrats festgestellt. Der Versuch war so durchgeführt worden, daß anstelle von Leucocytenproteasen Nasensekret von Ozaena-Patienten verwendet wurde. Da Azocasein nur von proteolytischen Enzymen gespalten werden kann, ist somit eine proteolytische Aktivität in solchen Nasensekreten nachgewiesen (s. Abb. 14).

4.63 Säurebehandlung des proteolytisch wirksamen Ozaena-Nasensekrets

Da Nasensekret von Ozaena-Patienten in der Lage ist, wie Leucocytenproteasen Azocasein zu spalten, ist anzunehmen, daß die nachgewiesene proteolytische Aktivität auf im Nasensekret vorhandene Leucocyten- und Bakterienproteasen zurückzuführen ist. Leucocyten sind in der Nasenschleimhaut von Ozaena-Patienten stets vorhanden. Es ist zu über-

legen, ob nicht doch ein Inhibitor im proteolytisch wirksamen Nasensekret existiert, der nur aufgrund einer Komplexbildung mit Proteasen inaktiv ist. Daß trotzdem proteolytische Aktivität nachweisbar ist, könnte theoretisch durch einen Überschuß an Proteasen erklärt werden.

Zur Verifizierung der Annahme des Vorhandenseins eines komplexgebundenen inaktiven Inhibitors müßten Proteasen durch starke Säure denaturiert und damit ausgefällt werden. Daher wurde proteolytisch wirksames Nasensekret mit 5%iger Perchlorsäure versetzt, gut gemischt, hochtourig während 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand filtriert.

In dem gewonnenen Überstand wurde eine mögliche Trypsin-hemmung gemessen (s. 5.411). Die oben aufgestellte Hypothese konnte durch Säurebehandlung nicht bestätigt werden, da keine inhibitorische Aktivität aufgetreten war bis auf einen Fall (s. Nr. 7 v. Abb. 14). Dieses Sekret zeigte nach der Säurebehandlung eine geringe inhibitorische Aktivität Trypsin gegenüber. Da in dem Fall 7 auch die geringste proteolytische Wirkung auftrat, ist der Schluß zulässig, daß eine proteolytische Aktivität nur dann im Nasensekret nachweisbar ist, wenn der Sekretinhibitor weitgehend fehlt.

Die Vermutung liegt nahe, daß im Nasensekret von Ozaena-Patienten tatsächlich kein Inhibitor vorhanden ist und zwar auch kein durch Leucocytenproteasen 'maskierter' Inhibitor mehr. Somit scheint Ozaena ein Krankheitsbild zu sein, das im fortgeschrittenen Stadium mit einer Atrophie der Schleimhaut einhergeht, was einem völligen Stillstand der Inhibitorproduktion gleichzusetzen ist.

4.64 Hemmung des proteolytisch wirksamen Nasensekrets

Für den Fall, daß die proteolytische Aktivität im Nasensekret tatsächlich durch aktive Proteasen verursacht wäre, müßte deren proteolytische Wirkung auch durch einen Inhibitor hemmbar sein.

4.641 Hemmung des proteolytisch wirksamen Nasensekrets mit NSI

Der Nachweis der Hemmbarkeit des proteolytisch wirksamen Nasensekrets mit NSI wurde mit Azocasein als unspezifisches Proteasensubstrat geführt (s. 5.413) mit dem Ergebnis, daß die proteolytische Wirkung pathologischen Nasensekrets durch konzentrierten Inhibitor aus normalem Nasensekret gehemmt werden kann. Allerdings waren nur etwa 50% der proteolytischen Aktivität des pathologischen Nasensekrets hemmbar (s. Abb. 15). Die Hemmkurven für proteolytisches Nasensekret und für Leucocytenhomogenate mit NSI laufen weitgehend parallel (vergl. Abb. 4). Die restliche, nicht hemmbare Aktivität des Ozaena-Nasensekrets dürfte auf das Vorhandensein von, durch Nasensekretinhibitor nicht hemmbaren Exopeptidasen und Bakterienproteasen zurückzuführen sein (s. 4.642).

4.642 Versuche zur Hemmbarkeit des proteolytisch wirksamen Nasensekrets durch HSMI

Es ergibt sich die Frage, ob proteolytische Aktivität in pathologischen Nasensekreten nur von Leucocytenproteasen oder nicht auch von Bakterienproteasen ausgeht. Einige Arten von Bakterienproteasen werden nicht von NSI, zum Teil aber von HSMI gehemmt. Für diesen Nachweis war ein Hemmversuch mit HSMI durchzuführen.

Man ließ HSMI mit steigender Konzentration auf proteolytisch wirksames Nasensekret einwirken. Die proteolytische Aktivität wurde mit Azocasein als Substrat gemessen (s. 5.413). Nach Abb. 16 trat keine Hemmung auf. Es kann also angenommen werden, daß die Arten von Bakterienproteasen, die im Ozaena-Nasensekret vorhanden sind, nicht von HSMI gehemmt werden.

Dieses Ergebnis wurde in einem weiteren Versuch bestätigt, indem man NSI und HSMI zusammen auf proteolytisch wirkendes Nasensekret einwirken ließ. Die mit Azocasein vorgenommene Messung (s. 5.413) ergab, daß kein größerer Hemmgrad als 50% erreicht werden konnte (s. Abb. 16).

5. Material und Methoden

5.1 Grundmaterial

5.11 Enzyme

- Trypsin: Merck, TPCK-behandelt;
- α -Chymotrypsin: Novo;
- Leucocytenproteasen (Gewinnung s. 5.23).

5.12 Substrate

- N ^{α} -Benzoyl-DL-arginin-4-nitroanilid-hydrochlorid: Merck (BAPA);
- Succinyl-L-phenylalanin-p-nitroanilid: Boehringer (SUFHEPA);
- Azocasein: Serva.

5.13 Inhibitoren

- Nasensekret-Inhibitor (SNI), (Gewinnung s. 5.21);
- Bronchialsekret-Inhibitor (BSI), (Gewinnung s. 5.22);
- Inhibitor aus der Submandibularisdrüse des Hundes (HSMI);
- Trypsin-Kallikrein-Inhibitor aus Schweinepankreas (Trasylol): Bayer;
- Serum-Inhibitoren (α_1 - Antitrypsin);
- Weizen-Inhibitor (WI);
- Feuerbohnen-Inhibitor (FI);
- Inhibitor aus sauren weißen Bohnen (WB sauer);
- Erdnuß-Inhibitor (PNTI II δ).

5.14 Säulenfüllungen

- Sephadex G-75: Pharmacia Uppsala;
- Sephadex G-100: Pharmacia Uppsala.

5.15 Antiserum

- Anti- α_1 -Antitrypsin von Kaninchen.

5.2 Gewinnung des Untersuchungsmaterials und dessen Gelfiltration

5.21 Gewinnung von Nasensekrethomogenat

Für die Gewinnung von Nasensekret wurden, mit physiologisch NaCl-Lösung getränkte Baumwolltampons 10 min lang in die unteren Nasengänge gelegt. Das anhaftende Sekret wurde mit je 2 ml Boratpuffer (0,05 M, pH 8,0) extrahiert und filtriert.

5.22 Gewinnung von Bronchialssekrethomogenat

Bronchialsekret wurde bei intubierten Patienten durch den Tubus mit einem sterilen Absaugschlauch entnommen und anschließend mit Boratpuffer (0,05 M, pH 8,0) aus den Schläuchen gespült und filtriert.

Bei beiden Sekrethomogenaten wurde der Inhibitorspiegel pro Patient Trypsin gegenüber gemessen (s. 5.411) und auf die darin vorhandene Proteinmenge bezogen.

5.23 Gewinnung von Leucocytenhomogenat

Zur Gewinnung von Leucocyten entnahm man den Kieferhöhlen verschiedener Patienten Eiter, schloß diesen im Zellhomogenisator mit Boratpuffer (0,05 M, pH 8,0) auf, zentrifugierte ihn 5 min lang hochtourig ($U = 6.000$) und erhielt

als Überstand ein Leucocytenhomogenat, das zum Testen verwendet werden konnte. Die Höhe der proteolytischen Aktivität des Homogenats wurde mit dem Substrat Azocasein bestimmt (s. 5.413).

5.24 Gelfiltration des Untersuchungsmaterials

Eine weitere Aufarbeitung der bisher gewonnenen rohen oder enteweißten (s. 5.31) Konzentrate erfolgte durch die Gelfiltration. Hochmolekulare Mucine, Proteine und saure Mucopolysaccharide können durch Adsorption an Proteasen deren proteolytische Aktivität unspezifisch hemmen. Um die Spezifität der Hemmwirkung von Inhibitoren herauszu-
christallisieren, werden durch Gelfiltration über Sephadex G-75 bzw. G-100-medium diese Stoffe entfernt.

Prinzip:

Das konzentrierte Stoffgemisch durchläuft ein Molekülsieb, wodurch das Material in höher- und niedermolekulare Anteil aufgetrennt wird. Das zur Elution verbrauchte Puffervolumen läßt einen Schluß auf das Molekulargewicht zu.

Material:

Boratpuffer als Elutionsmittel (0,05 M, pH 8,0; 38,1 g Natriumtetraborat in 1.000 ml H₂O gelöst und auf pH 8,0 eingestellt);

Sephadex G-75 bzw. G-100;

Säule: 1,7 x 175 cm, die zuvor mit Dextranblau, Chymotrypsinogen und Cytochrom kalibriert wird.

Durchführung:

Auf eine mit Sephadex G-75 bzw. G-100-medium gefüllte Säule wird der konzentrierte (entsprechend 200 mg Protein) Stoff mit einer Pipette aufgegeben und mit Boratpuffer eluiert.

Die in den Fraktionen zu 4 ml vorhandenen Aktivitäten werden durch Bestimmung der Trypsinhemmung bei Inhibitoren (s. 5.411) bzw. der Azocaseinspaltung bei Proteasen (s. 5.413) lokalisiert und vereinigt.

5.3 Weitere Aufarbeitung der Homogenate und Konzentrate

5.31 Enteiweißung

Für die Aufarbeitung großer Sekretmengen ergab sich die Notwendigkeit einer Behandlung mit 5%iger Perchlorsäure. Diese führt zur Ausfällung von Proteinen, Leucocytenproteasen, Bakterienproteasen und α_1 -Antitrypsin. Durch fünf Minuten währendes hochtouriges Zentrifugieren wurde der Niederschlag aus der Lösung entfernt. Es verblieb ein saurer Überstand, der mit KOH wieder neutralisiert wurde. Dabei fiel Salz als $KClO_4$ aus, das anschließend abzentrifugiert wurde.

5.32 Einengung

Die Einengung größerer Mengen enteweißten Sekrets erfolgte durch den Rotationsverdampfer im Vakuum. Das Konzentrat wurde durch eine Druckdialysekammer weiter eingeengt.

5.33 Entsalzung

Für eine Gefriertrocknung ist die Entsalzung des Materials erforderlich. Diese erfolgt für das Sekretkonzentrat durch mehrmaliges Aufnehmen deionisierten Wassers in der Druckdialysekammer.

Eine Entsalzung des Leucocytenkonzentrats ist nach dieser Methode nicht möglich, da durch die Rührvorgänge in der Druckdialysekammer Enzyme denaturiert werden können. Daher

wird das zu entsalzende Leucocytenkonzentrat in einen Dialyseschlauch gefüllt, dieser 24 Stunden lang in fließendes Wasser und anschließend in Aqua dest. gehängt, um CaCO_3 aus der Lösung zu entfernen.

5.34 Lyophilisierung

Die entsalzten Stoffe werden für die Aufbewahrung gefriergetrocknet. Es entsteht ein flockiges, weißes, nicht hygroskopisches Pulver mit einem Wassergehalt von etwa 5%.

5.4 Methodischer Aufbau der Versuchsreihen

5.41 Bestimmung der Enzymhemmung

5.411 Hemmung von Trypsin.

Prinzip:

Trypsin setzt spezifisch aus dem Substrat BAPA p-Nitroanilid frei. Die Freisetzung von p-Nitroanilid läßt sich anhand der Extinktionszunahme bei 405 nm direkt verfolgen.

Material:

Trypsin: 5 mg in 100 ml 0,0025 n HCL lösen ($50 \mu\text{g/ml}$ Protein $\hat{=}$ 50 mU/ml);

Triäthanolaminpuffer (TRA-puffer; 0,2 M Tra; pH 7,8; 0,1 M CaCl_2): 18,6 g Tra und 7,35 g $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$ in 450 ml Wasser lösen, mit 2 N NaOH auf pH 7,8 einstellen, mit Wasser auf 500 ml auffüllen;

BAPA-Substrat: 100 mg in 100 ml destillierten H_2O bei +95° lösen.

Trypsinaktivität liegt in Ca^{2+} -haltigem Puffer um 4% höher als in nicht Ca^{2+} -haltigem Puffer.

Durchführung:

Die Durchführung der Hemmwertbestimmung erfordert einen Vergleichswert, um darauf alle gemessenen Hemmwerte beziehen zu können. Zur Vergleichswertbestimmung werden 0,2 ml (10 g) Trypsin in Glasküvetten ($d = 1,0 \text{ cm}$) gegeben und mit TRA-Puffer auf 2 ml aufgefüllt. Die Reaktion wird erst durch Zugabe von 1 ml (1 mg) BAPA-Substratlösung gestartet. Dabei bewirkt 1 g Trypsin eine Extinktionsänderung ΔE_{405} von 0,00332/min in 3 ml Ansatz.

Zur Hemmwertbestimmung von Trypsin werden 0,2 ml Trypsin mit der zu bestimmenden inhibitorhaltigen Lösung versetzt und mit TRA-Puffer auf 2 ml ergänzt. Die eingesetzte Menge der inhibitorhaltigen Testlösung soll so bemessen sein, daß eine etwa 50%ige Hemmung der Trypsinaktivität zu erwarten ist, um Meßfehler zu vermeiden, die durch Messung im nichtlinearen Teil einer Hemmkurve zustandekommen. Die Lösungen werden gut gemischt und etwa 1 - 2 min bei 25° (= Meßoptimum) vorinkubiert. Anschließend wird mit 1 ml Substratlösung die Reaktion gestartet. Man liest die Extinktionen 5 Minuten hindurch jede Minute am Eppendorff-Photometer ab und berechnet die Extinktionsänderung (ΔE_{405}) pro Minute. Die erhaltenen Zahlenwerte ermöglichen die Berechnung des arithmetischen Mittels.

Aus der Differenz des Vergleichs- und Hemmwertes ergibt sich die Extinktionsverminderung, aus welcher der Inhibitorgehalt der Testlösung bestimmt werden kann.

$$\Delta E_{\text{Vergleichswert}} - \Delta E_{\text{Hemmwert}} = \Delta E_{\text{Verminderung}}$$

Eine Inhibitoreinheit ist so definiert, daß eine ImU Inhibitor/mg Protein die hydrolytische Wirkung von $\frac{1}{2} \text{ g}$

Trypsin gegen BAPA aufhebt. Eine Verminderung der Extinktionsänderung von 0,00332/min entspricht also einer ImU.

$$\frac{\Delta E_{\text{Verminderung}}}{0,00332} = \text{Zahl der ImU in der Testlösung}$$

5.412 Hemmung von Chymotrypsin

Prinzip:

Chymotrypsin setzt p-Nitroanilin aus N-3-(Carboxypropionyl)-L-phenylalanin-p-nitroanilid (CPPN) frei. Das Substrat wird auch als N-Succinyl-L-phenylalanin-p-nitroanilid (SUPHEPA) bezeichnet.

Material:

Triäthanolaminpuffer (TRA-puffer; 0,2 M Tra; pH 7,8; 0,1 M CaCl_2): 18,6 g Tra und 7,35 g $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ in 450 ml Wasser lösen, mit 2 N NaOH auf pH 7,8 einstellen, mit Wasser auf 500 ml auffüllen;

Chymotrypsin (1 m Protein/ml, ca 50 mU/ml): 10 mg

Trockenpulver in 10 ml 0,001 N HCL lösen;

Suphepa-Substrat (12,9 mM): 250 mg in 50 ml TRA-Puffer lösen.

Durchführung:

Der Ablauf der Bestimmung der Hemmwirkung erfolgt wie unter 5.411 dargestellt mit dem einen Unterschied, daß die Extinktionsänderung hier wegen des langsamen Spaltvorgangs des Substrats alle 10 Minuten abgelesen wird.

Eine Probe enthält 1 ImU, wenn die Wirkung von $\frac{1}{10}$ g Chymotrypsin aufgehoben wird.

5.413 Hemmung von Leucocytenproteasen

Prinzip:

Proteasen bauen Azocasein ab. Die Spaltprodukte von Azocasein sind in Trichloressigsäure löslich. Somit kann der Azocaseinabbau anhand der Extinktionszunahme bei 366 nm photometrisch verfolgt werden.

Material:

Azocasein 2%ig: 200 mg unter vorsichtigem Erwärmen bis zu 80° in 10 ml Phosphatpuffer gelöst;

Trichloressigsäure 5%ig: 5 g in 100 ml Wasser lösen;

Phosphatpuffer 0,1 M, pH 8,0: 7,84 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ und 0,784 g KH_2PO_4 mit Wasser ad 500 ml lösen.

Durchführung:

Die Durchführung der Aktivitätsbestimmung von Proteasen bzw. deren Hemmung erfordert die Ermittlung eines Leerwertes von Azocasein, um darauf alle zu messenden Werte beziehen zu können. Zur Leerwertsbestimmung werden in ein Reagensglas 1 ml Phosphatpuffer einpipettiert und mit 2 ml Azocasein aufgefüllt. Nach gutem Mischen inkubiert man 1 - 3 Stunden lang diese Lösung im Wasserbad von 37°. Danach gibt man 3 ml Trichloressigsäure hinzu, mischt wiederum, läßt die Lösung 5 Minuten lang bei Zimmertemperatur stehen, zentrifugiert hochtourig 5 Minuten lang, filtriert den Überstand ab und gibt diesen zur Messung bei 366 nm in eine Küvette.

Zur Aktivitätsbestimmung proteolytischer Enzyme gibt man die enzymhaltige Lösung in ein Reagensglas, füllt mit Phosphatpuffer ad 1 ml auf, fügt 2 ml Azocasein hinzu und verfährt wie zuvor beschrieben, um dann die Extinktion gegen den Leerwert von Azocasein zu messen.

Die Höhe der Extinktion ist proportional der zugegebenen Menge des Enzyms. Eine Angabe von definierten Enzymeinheiten ist wegen der Unspezifität des Substrats nicht möglich. Man vergleicht daher die proteolytische Aktivität des Enzyms mit der Wirkung von definierten Trypsinmengen auf das gleiche Substrat. Dazu ist eine Eichkurve mit definierten Trypsineinheiten erforderlich.

Zur Hemmwertbestimmung von Enzymen wird eine in Reagensgläser gegebene Enzymmenge mit steigender Proteaseninhibitorkonzentration versetzt und mit Phosphatpuffer ad 1 ml ergänzt. Nach gutem Mischen und kurzer Vorinkubation werden 2 ml Azocasein hinzugefügt. Das weitere Verfahren entspricht dem oben dargestellten. Die Hemmung bei Inhibitorzusatz wird auf die gehemmte hydrolytische Wirkung des Enzyms Azocasein gegenüber bzw. auf die Aktivitätsverminderung des Enzyms bezogen.

5.42 Nachweis von α_1 -Antitrypsin

Prinzip:

Der Nachweis von α_1 -Antitrypsin erfolgt durch die Immunelektrophorese. Dabei wird ein Stoff durch die Stromstärke in der Elphorkammer in verschiedenen geladene Bereiche aufgetrennt. Die Wanderungsgeschwindigkeit zur Anode bzw. zur Kathode richtet sich nach der Größe des Molekulargewichts und nach der Art der Ladungen.

Material:

Objektträger mit Agargelschicht, Format 60 x 130 mm;
Veronalpuffer, 0,01 M, pH 7,8;

Elphorkammer:

Anti- α_1 -Antitrypsin von Kaninchen.

Durchführung:

Zum Nachweis von α_1 -Antitrypsin in einer Lösung wird ein Objektträger mit einer Agargelschicht überzogen. In die Schicht wird eine Rille eingeritzt, zu deren Seiten je ein

sich gegenüber liegendes Loch ausgestanzt wird. Mit Hilfe einer Mikropipette gibt man in eines der beiden Löcher den auf α_1 -Antitrypsin zu prüfenden Stoff und in das andere Loch ein Serum. Es erfolgt zuerst eine elektrophoretische Auftrennung. Danach wird die eingestanzte Rille entfernt und Anti α_1 -Antitrypsinserum eingefüllt. Beim Auftreten von Antiserum auf die zu untersuchenden Antigene bilden sich Praezipitationslinien. Wäre α_1 -Antitrypsin in der zu untersuchenden Lösung vorhanden, so müßten sich auch mit diesem Stoff Praezipitationslinien ergeben. Lügen die auf den entgegengesetzten Seiten der Rille erscheinenden Praezipitationslinien in gleicher Höhe, wäre dies ein Beweis für das Vorhandensein von α_1 -Antitrypsin im Untersuchungssstoff.

6. Das Untersuchungsergebnis in seiner Bedeutung

6.1 Zusammenfassung

Im Verlaufe der Arbeit konnte nachgewiesen werden, daß im Bereich der oberen Luftwege neben dem NSI im Nasenraum ein weiterer Hemmstoff BSI im Bronchialbereich direkt sezerniert wird. Die Untersuchung beider Hemmstoffe ergab eine Reaktions- und Funktionsgleichheit, was zumindest auf eine Analogie der Inhibitoren schließen läßt. Die Annahme einer Identität müßte in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

Als bisher festgestellte Aufgabe in ihrem Bereich ergab sich die Hemmung leucocytärer Proteasen mit einem Hemmgrad von ungefähr 75%. Neben anderen bekannten hochmolekularen Hemmstoffen leucocytärer Proteasen wie z.B. Serumproteine dürften diese als niedermolekular erkannten Inhibitoren hauptverantwortlich für die inhibitorische Kapazität in den Sekreten und Schleimhäuten der oberen Luftwege sein.

Die Beobachtungen und Messungen des Inhibitorspiegels pro Patient ergaben dessen Abhängigkeit von dem jeweiligen Entzündungszustand der Schleimhaut. Für eine Steuerung des Inhibitorspiegels von außen im Falle einer pathologischen Entgleisung wurde für eine Beeinflussungsmöglichkeit nach Substituten für den Inhibitor gesucht. Entsprechende Versuche mit pflanzlichen und tierischen Stoffen verliefen bisher negativ.

Aufgrund der ähnlichen Wechselwirkung niedermolekularer Inhibitoren mit Trypsin, Chymotrypsin und Leucocytenproteasen wurde erwartet, daß die aktiven Zentren leucocytärer Proteasen ähnlich wie bei Pankreasproteasen gebaut sein müßten. Die Versuche dieses Nachweises blieben ohne Ergebnis.

Die Hemmung leucocytärer Proteasen im Bereich der oberen Luftwege erfolgt nicht nur durch Serumproteine, wie bisher angenommen wurde, sondern größtenteils durch einen im Sekret selbst vorhandenen Inhibitor.

6.2 Ausblick

Das Ergebnis der durchgeführten Untersuchungen hat mehr als einen erkenntnistheoretischen Wert. Die Korrelation zwischen niedermolekularen Inhibitoren und leucocytären Proteasen ermöglicht, den Inhibitorspiegel als diagnostisches Hilfsmittel einzusetzen bei der Bestimmung des Intensitätsgrades einer pathologischen Entgleisung in den oberen Luftwegen.

Die Kenntnis spezifischer Inhibitoren und ihrer Funktionen eröffnet eine Möglichkeit therapeutischer Beeinflussung des Inhibitorspiegels bei pathologischen Zuständen. Dieser könnte erfolgen durch Verwendung von exogenen Inhibitoren, durch Wiederfreisetzen inaktiv gewordener Inhibitoren, durch Anregung der endogenen Inhibitorproduktion oder durch spezifische Hemmung der proteolytischen Enzyme mit Hilfe anderer Mechanismen.

Literaturverzeichnis

1. Hochstraßer K., Haendle H., Reichert R., Werle E.,
z. physiol. Chem. 352, 954 (1971)
2. Fritz H., Gebhardt M., Hochstraßer K., Werle E.,
z. physiol. Chem. 350, 939 (1969)
3. Reichert R., Hochstraßer K., Werle E.,
z. Laryng. Rhinol. 50 i. Dr. (1971)
4. Laskowski, M., Sr., P.C.Wu ,
I. Biol. Chem. 201, 797, (1953)
5. Karlson P.,
Biochemie 128 - 135, (1969), Stuttgart
6. Pschyrembel, W.,
klin. Wörterbuch, 690 - 691, (1969), Berlin
7. Frey E.K., Kraut H., Werle E.,
Das Kallikrein-Kinin-System und seine Inhibitoren
Stuttgart 1968
8. Hochstraßer K., unveröffentlicht
9. Hochstraßer K., Werle E.,
z. physiol. Chem. 350, 249 (1969)
10. Hochstraßer K., Illchmann K., Werle E.,
z. physiol. Chem. 350, 1225 (1969)
11. Fritz H., Jaumann E., Meister R., Pasquay P.,
Hochstraßer K., Fink E.,
Proc. of the Intern. Res. Conf. on Proteinase Inhib.
1970 S.258 W. de Gruyter Berlin
12. Hochstraßer K., Reichert R., unveröffentlicht
13. Hochstraßer K., Reichert R., Werle E., unveröffentlicht

14. Vogel R., Trauschold I., Werle E.,
Natural Proteinase Inhibitors, Acad. Press
New York 1968
15. Fritz H., Trauschold I., Werle E., in
H.U.Bergmeyer, Meth. der enzymatischen
Analyse, Verlag Chemie 1970
16. Werle E., Trauschold I., Haendle H., Fritz H.
Physiologie, Pharmacologie and Clinical
Aspects of Proteinase Inhibitors
Annual of the New York Acad. of Sciences

Herrn Prof.Dr.H.H.Naumann, Direktor der Hals-Nasen-Ohren-Klinik der Universität München, danke ich für die Überlassung eines Arbeitsplatzes an seiner Klinik.

Meinen herzlichsten Dank möchte ich Herrn Priv.Doiz. Dr.K.Hochstraßer sagen, für die Bereitstellung des Themas und des Laborplatzes, für viele Diskussionen, Anregungen und Hilfen.

Für die freundliche Zusammenarbeit und den regen Anteil am Fortgang meiner Arbeit bedanke ich mich bei Herrn Priv.Doiz.Dr.R.Reichert..

Dank möchte ich aussprechen dem ganzen Arbeitskreis Hochstraßer, besonders Frl. Sibylle Schwarz für die geduldige Anleitung und Einarbeitung.

Lebenslauf

Geboren:	13.2.1948 in München
Vater:	Paul Matzner, Ingenieur
Mutter:	Hedwig, geb. Scholz
1954 -58	Volkschule am Anger München
1958 -67	neusprachliches Gymnasium am Anger München
seit Okt.1967:	Medizinstudium an der Universität in München
Oktober 1968:	Vorphysikum
April 1970:	Physikum
Okt.1970 -Okt.1971	zweisemestriger Studienaufenthalt in Lausanne
Juni 1973:	Staatsexamen in München

Monika Elisabeth Matzner

